



Développement de langue électronique : étude de mélanges complexes et de bactéries

Laurie-Amandine Garçon

► To cite this version:

Laurie-Amandine Garçon. Développement de langue électronique : étude de mélanges complexes et de bactéries. Matériaux. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAI069 . tel-01258962

HAL Id: tel-01258962

<https://theses.hal.science/tel-01258962>

Submitted on 19 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Matériaux, mécanique, génie civil, électrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Laurie-Amandine GARÇON

Thèse dirigée par **Martial BILLON** et
codirigée par **Yanxia HOU-BROUTIN**

préparée au sein des laboratoires :

Semi-Conducteur Grand Gap (SC2G) de l'Institut Néel

Et

**Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages
Biologiques (CREAB / SPrAM / INAC) du CEA GRENOBLE
dans l'École Doctorale I-(MEP)2**

Développement de langue électronique: Etudes de mélanges complexes et de bactéries.

Thèse soutenue publiquement le **5 Novembre 2015**,
devant le jury composé de :

M. Didier DELABOUGLISE

Professeur INP-Grenoble, Président

Mme. Nicole JAFFREZIC-RENAULT

Directrice de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon I,
Rapporteur

Mme. Emmanuelle LAURENCEAU

Maitre de conférences à l'Institut des nanotechnologies de Lyon,
Rapporteur

M. Loïc BRIAND

Directeur de recherche INRA au Centre des Sciences du Goût et de
l'Alimentation de Dijon, Membre

M. Martial BILLON

Maitre de conférences à Université Grenoble, Membre

Mme. Yanxia HOU-BROUTIN

Chargée de recherche CNRS au CEA Grenoble, Membre

M. David EON

Maitre de conférences à Université Grenoble, Invité



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES



**Développement d'une langue
électronique :
Etudes de mélanges complexes et de
bactéries**

Thèse de

Laurie-Amandine GARÇON

Grenoble 2015

A la mémoire de Franck et de Papy
Partis tous deux trop vite et à quelques jours d'intervalle.
Merci à vous pour tout ce que nous avons partagé
Et tout ce que vous m'avez transmis pour le reste de ma vie.

Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir évalué mon travail de thèse, les examinatrices les Docteurs *Nicole JAFFREZIC-RENAULT* et *Emmanuelle LAURENCEAU*, le Docteur *Loïc BRIAND* présent en qualité de rapporteur, et aussi le Président du jury le Professeur *Didier DELABOUGLISE*. Je tiens à vous remercier pour l'ensemble de vos remarques et discussions ainsi que pour vos encouragements pour mon futur avenir personnel mais aussi professionnel.

Ce travail scientifique est rendu possible par les personnes aussi bien scientifiques qu'administratives qui m'ont accompagnée et suivie tout au long de ces 3 ans.

Je pense d'abord mes encadrants *David EON* pour sa patience lors de mes formations sur les réacteurs pour la croissance de diamants ainsi que pour mes questions, *Martial BILLON* pour m'avoir aidée sur toutes mes questions sur l'enseignement et la pédagogie. Merci également aussi à d'avoir accepté de reprendre la casquette de Directeur de thèse durant ma dernière année de thèse. Même s'il ne lira pas ces mots je tiens aussi à remercier *Franck OMNES* de m'avoir fait confiance pour ce projet de thèse notamment pour la partie diamant que j'ai découverte avec lui. Tu as été une personne magnifique et tu m'as beaucoup apporté aussi bien scientifiquement qu'humainement, toujours disponible, à l'écoute et souriant malgré tes difficultés. Et enfin je remercie Yanxia de m'avoir prise en stage puis en thèse, de m'avoir fait confiance, de m'avoir poussée à aller plus loin, d'avoir été ce pilier solide durant ces trois ans notamment pendant cette dernière année qui n'a pas été évidente. Je te remercie pour tout.

Merci à la fondation LANEF qui a financé ce travail et qui a été représentée plus particulièrement par *Joël CIBERT (Président)*, *Xavier THIBAUT* et *Stéphanie MONFRONT*.

Je remercie aussi l'ensemble des permanents de mes deux équipes: *Yanxia HOU-BROUTIN*, *Martial BILLON*, *Thierry LIVACHE*, *Roberto CALEMCZUK*, *Arnaud BUHOT*, *André ROGET*, *Aurélien BOUCHET-SPINELLI*, *Loïc LEROY*, *Elodie BIDAL*, *Yoann ROUPIOZ*, *Pascal MAILLEY*, *Raphael MATHEY*, *José GALVEZ*, *Charles PICOT*, *Céline DELEVAL*, *Sarah MAUDUIT* (pour le CEA) mais aussi *David EON*, *Etienne GUEERAERT*, *Etienne BUSTARRET*, *Julien PERNOT*, *Pierre MURET*, *Valérie REITA*, *Sébastien PAIRIS*, *Pierre GIROUX*, *David BARRAL*, *Florence POIS*, *Sabine GADAL* (pour le CNRS) ainsi que les collaborateurs dans ce projet des équipes de *David BONNAFFE (Université Paris Sud)* et *Hugues LORTAT-JACOB (IBS)*.

Les non permanents post-doctorant, thésards, stagiaires ont également participé à la joie de vivre des labos, des pause-café, des manips mais aussi des sorties extérieures. Un grand

merci à Yulia, Nora, Stacie, Laure, Sandrine, Agnès, FX, Samuel, Samia, Cyril, Emilie, Maria, Camille, Isabel, Radé, Fériel, Loïc, Abou, Pierre, Clément, Jessica, Alexandre, Aurélien, Gauthier, Farida, Vincent, Karim, Chenze, Charles, Florian, Dayane, Mélissa, Benjamin, Hans, Sami, Yanjie, Nadia, Sophie, Aurélian, Ricardo, Marie, Damien, Violette, Hillary, Grégory, Marion, Clothilde, Greg, Kévin... Avec un remerciement particulier aux stagiaires que j'ai encadrés pour leurs bonnes humeurs, leurs questions et leurs motivations!!

Je remercie également *Augustine ALESSIO*, la secrétaire de mon école doctorale.

Et puis MERCI à tous ceux qui m'ont accompagnée dans ma vie depuis bien longtemps : ma famille, mes amis, ainsi que toutes les personnes que j'ai rencontrées et qui ont vécu cette thèse de plus ou moins loin. Un immense merci à *Pouney, Mounette et Princesse* mais aussi mon *Juju* qui a vécu, participé et subi parfois, jour après jour cette aventure. Merci à toi pour ton amour, ta patience et tous tes petits plats préparés avec de plus en plus de réussite au fur et à mesure de l'avancement de ma thèse, ainsi que ton choix de me suivre dans notre nouvelle aventure à l'étranger...

MERCI à tous !!!

Table des Matières

Liste des abréviations.....	13
Introduction générale.....	17
1 Contexte du projet et l'état de l'art	21
1.1 Comparaison biocapteurs/biopuces et nez/langues électroniques.....	21
1.2 Sources d'inspiration : systèmes gustatif et olfactif humain.....	24
1.2.1 Le système gustatif humain	24
1.2.2 Le système olfactif humain.....	26
1.3 Conceptions des eN/eT en analogie avec les systèmes olfactifs.....	29
1.4 Etat de l'art des langues électroniques.....	32
1.4.1 Langues électroniques utilisant des transducteurs électrochimiques	33
1.4.2 Langues électroniques utilisant des transducteurs basés sur une variation de masse	38
1.4.3 Systèmes basés sur les transducteurs optiques	41
1.5 Projet de thèse.....	53
2 Construction de notre langue électronique	57
2.1 Un système de transduction : la résonance des plasmons de surface.....	57
2.1.1 Phénomène de résonance plasmon de surface.....	57
2.1.2 Le système d'imagerie par résonance des plasmons de surface	61
2.1.3 Paramétrage du système	62
2.2 Système SPRi utilisé pour la construction de langue électronique	64
2.2.1 Montage optique de SPRi.....	64
2.2.2 Montage fluide.....	65
2.3 Réalisation du réseau de récepteurs combinatoires	67
2.3.1 Prétraitement du prisme.....	67
2.3.2 Description des molécules sondes utilisées	67
2.3.3 Préparation et réalisation des récepteurs combinatoires à réactivité croisée..	68
2.4 Traitement des données	71
2.4.1 Méthode de discrimination.....	72
2.4.2 Méthode de classification.....	73
3 Analyse des mélanges complexes par le système de langue électronique	77
3.1 Analyse des mélanges complexes vin/bière/lait	77
3.1.1 Différentiation des 3 mélanges complexes.....	78
3.1.2 Classification des 3 mélanges complexes	79

3.2	Analyse de différents types de laits	81
3.2.1	Caractéristiques des boissons analysées.....	81
3.2.2	Discrimination des boissons.....	82
3.2.3	Différenciation des boissons par leurs profils continus 2D et leurs images 3D.....	85
3.2.4	Classification des boissons.....	87
3.3	Suivi du vieillissement du lait.....	89
3.4	Etude de stabilité et de reproductibilité du système	91
	Conclusion	93
4	Analyse de bactéries par le système de langue électronique	97
4.1	Méthodes de détection et d'identification des micro-organismes.....	99
4.1.1	L'identification des micro-organismes.....	99
4.1.2	Méthodes de détection rapides	100
4.2	Les Bactéries utilisées au cours de l'étude	103
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	103
4.2.2	<i>Salmonella</i>	103
4.2.3	<i>Staphylococcus</i>	103
4.3	Procédures générales d'étude des bactéries	105
4.3.1	Mise en culture des bactéries	105
4.3.2	Procédure d'analyse.....	105
4.3.3	Procédure de régénération et de conservation du prisme	105
4.4	Optimisation des paramètres fluidique d'étude des bactéries	106
4.4.1	Sélection de la forme de la cuve fluidique.....	106
4.4.2	Optimisation de la profondeur de la cuve	107
4.4.3	Détermination du débit fluidique du système	110
4.5	Etude de faisabilité d'analyse des bactéries	111
4.5.1	Discrimination inter-espèces.....	113
4.5.2	Discrimination entre les souches.....	114
4.6	Application de la langue électronique pour l'analyse des bactéries pathogènes	117
4.6.1	Etude des différentes souches pathogènes.....	117
4.6.2	Classification des bactéries étudiées par PCA.....	121
4.7	Détection des bactéries dans un milieu complexe: le lait	122
	Conclusion	125
	Conclusion générale.....	127
	Annexe 1	129
A-1	Fabrication et caractérisation de microélectrodes de diamant	131

<i>A-1.1</i>	<i>Le diamant.....</i>	<i>131</i>
<i>A-1.2</i>	<i>Fabrication du réseau de microélectrodes diamant.....</i>	<i>138</i>
<i>A-1.3</i>	<i>Test de fonctionnalisation et caractérisations du diamant.....</i>	<i>142</i>
<i>A-1.4</i>	<i>Conclusion.....</i>	<i>151</i>
Annexe 2	Les bâtis de croissance diamant.....	153
Annexe 3	La spectroscopie Raman	157
Annexe 4	Plan de dépôt des 11 mélanges de solution pour les récepteurs combinatoires	161
Bibliographie	163

Liste des abréviations

2D	Deux Dimension
3D	Trois Dimension
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANN	Réseau de Neuron Artificiels / <i>Artificial Neural Network (En.)</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Au	Or
BB	Briques de bases/ <i>Building Block (En.)</i>
BEN	<i>Bias Enhanced Nucleation</i>
BDD	Diamant dopé au bore / <i>Bore Doped Diamond (En.)</i>
BSA	Albumine de sérum bovin / <i>Bovine Serum Albumin (En.)</i>
CCD	Dispositif à transfert de charge (capteur photographique) / <i>Charge-Coupled Device (En.)</i>
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
ChemFET	<i>Chemical Field-effect Transistor (En.)</i>
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COV	Composés Organiques Volatiles
CP	Composante Principale
CREAB	Laboratoire pour la Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques
CVD	Dépôt en phase vapeur / <i>Chemical Vapour Deposition(En.)</i>
eN	Nez électronique / <i>Electronic Nose(En.)</i>
eT	Langue électronique/ <i>Electronic Tongue(En.)</i>
ECL	<i>Erythrina Cristagalli Lectin (En.)</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENFET	Transistor à effet de champ modifié par une ou des enzyme / <i>ENzyme Modified FET (En.)</i>
FET	Transistor à effet de champ / <i>Field-effect Transistor (En.)</i>
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>
Protéine G	<i>Guanosine nucleotide binding Protein</i>
GFP	Protéine fluorescence verte / <i>Green Fluorescent Protein (En.)</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPHT	Haute Pression Haute Température

ICP	<i>Inductively Coupled Plasma (En.)</i>
IEC	Image d'Evolution Continue
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
INSET	<i>Intelligent Sensor Technology Incorporation</i>
ISE	Electrode sélective aux ions/ <i>Ion-Selective Electrode (En.)</i>
LANEF	Laboratoire d'Alliances Nanosciences-Energie du Futur
LDA	Analyse Discriminante Linéaire / <i>Linear discriminant analysis (En.)</i>
LED	Diode électroluminescente / <i>Light-Emitting Diode (En.)</i>
MALDI-TOF	désorption-ionisation laser assistée par matrice / <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation -Time of Flight (En.)</i>
MEA	Réseau de microélectrodes / <i>Micro Electrode Array (En.)</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage / <i>Scanning Electron Microscopy (SEM) (En.)</i>
MEMS	Microsystème électromécanique / <i>Micro-Electromechanical System (En.)</i>
MOS	<i>Metal Oxide Semiconductor (En.)</i>
MOSFET	Transistor à effet de champ à grille isolée / <i>Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor (En.)</i>
MRSA	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline / <i>Methicillin-resistant S. aureus (En.)</i>
MSSA	Staphylococcus aureus sensible à la méticilline / <i>Methicillin-sensitive S. aureus (En.)</i>
MPCVD	Dépôt vapeur en phase chimique assistée par plasma micro-onde / <i>Microwave Plasma Chemical Vapor Deposition (En.)</i>
NEMS	Nano-système électromécanique <i>Nano Electro-Mechanical System</i>
NID	diamant non intentionnellement dopé / <i>Non Intentionally Doped (En.)</i>
NIRIM	<i>National Institute for Research in Inorganic Materials</i>
NP	Nanoparticule
NPF	Nanoparticule Fonctionnalisée
OBP	<i>Odorant Binding Proteins</i>
OMS	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
OR	Récepteur Olfactif / <i>Odorant Receptor (En.)</i>
PBS	Tampon Phosphate salin / <i>Phosphate buffered salin</i>
PCA	Analyse en Composantes Principales/ <i>Principal Component Analysis (En.)</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase Chain Reaction (En.)</i>
PEEK	Plastique polyétheréthercétone
PEG	Polyéthylène glycol

PET	Polyéthylène téréphtalate
pI	Point Isoélectrique
PPE	Para-Phénylène-Ethynylène
QCM	Microbalance à quartz / <i>Quartz Cristal Microbalance (En.)</i>
SAM	Monocouche auto-assemblée / <i>Self-Assembled Monolayer (En.)</i>
SAPE	<i>Streptavidine-R-Phyco-Erythrine</i>
SAW	<i>Surface Acoustic Wave</i>
SC2G	Laboratoire Semi-Conducteur Grand Gap
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPR	Résonance plasmonique de surface / <i>Surface Plasmon Resonance (En.)</i>
SPrAM	Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires
SPRi	Imagerie de résonance plasmonique de surface / <i>Surface Plasmon Resonance imaging (En.)</i>
TCP	<i>Tétra-Carboxy-Phényl-Porphyrine</i>
TE	Transverse électrique
TM	Transverse magnétique
TPP	Tétra-Phényl-Porphyrine
TSB	<i>Trypsin Soya Broth (En.)</i> (milieu nutritif de croissance)
UHT	Ultra Haute Température/ <i>Ultra High Temperature (En.)</i>
UV	Ultraviolet

Introduction générale

Depuis toujours la nature est une grande source d'inspiration pour l'Homme aussi bien pour l'imiter que pour la comprendre. S'inspirant de l'odorat, Persaud et Dood ont décrit en 1982, un système de capteurs multiplexés mimant le système olfactif humain pour la reconnaissance d'odeurs. Ce dispositif innovant a permis l'émergence d'une famille de capteurs : les nez et langues électroniques (eN/eT). Ces systèmes à la différence des capteurs dits conventionnels, reposent sur un principe de capteurs à réactivités croisées, où les récepteurs mis en jeu ne possèdent ni spécificité ni sélectivité (affinité) particulière pour une molécule donnée. Ainsi une cible peut être reconnue par plusieurs récepteurs et un récepteur peut reconnaître différentes cibles. Le signal de reconnaissance ne peut donc être décrit que par l'ensemble des réponses de chaque récepteur qui constituent alors un motif de reconnaissance propre à l'échantillon analysé. Ces systèmes applicables dans des domaines très variés tels que l'environnement, l'industrie pharmaceutique et alimentaire ou encore de la santé ont suscité un intérêt grandissant pour les industriels et les chercheurs. Le développement des eN/eT a conduit à la conception et à la réalisation de nouveaux matériaux sensibles (sondes) ainsi qu'à l'utilisation de divers systèmes de transduction de types électriques, optiques ou basés sur des variations de masses.

Depuis 2012, notre laboratoire a développé une langue électronique basée sur des récepteurs combinatoires à réactivités croisées, et couplée au système de transduction d'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi). L'approche mise en œuvre a pour but de simplifier la réalisation des matériaux sensibles en utilisant de petites molécules simples appelés briques de bases. Ces dernières, aux propriétés physico-chimiques différentes, peuvent être mélangées à différents ratios contrôlés pour constituer des récepteurs combinatoires à réactivités croisées lors de leur auto-assemblage sur une surface d'or. Il est ainsi possible d'obtenir rapidement et facilement un très grand nombre de récepteurs en modifiant les ratios de mélange ou en introduisant de nouvelles briques de bases. Le système de SPRi quant à lui permet de pouvoir suivre les interactions cibles-sondes sans marquage et en temps réel.

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'explorer les potentielles applications de notre système de langue électronique pour l'analyse et la discrimination de différents milieux et objets complexes.

Le premier chapitre de ce manuscrit décrit les systèmes gustatif et olfactif humain afin d'introduire les matériaux sensibles et les transducteurs réalisés pour développer les nez et langues électroniques. Par la suite, ce manuscrit développera l'élaboration et le fonctionnement de la langue électronique composée d'un réseau récepteurs combinatoires à réactivités croisées associé à un système de résonance de plasmons de surface. Puis nous détaillerons plus

particulièrement les études applicatives réalisées dans un premier temps pour la discrimination de milieux complexes (vin, bière, lait, bactéries) afin d'évaluer le potentiel de notre système pour des applications de contrôles dans le secteur alimentaire. Dans un second temps nous décrirons les études menées pour la détection et l'identification d'objets complexes comme les bactéries par l'étude de genres, d'espèces et de souches non pathogènes ou pathogènes.

Chapitre 1

*Contexte du projet
et
état de l'art*

1 Contexte du projet et l'état de l'art

Dans les domaines de l'industrie, de l'environnement, de la santé, les contrôles et vérifications représentent des étapes critiques et essentielles afin de déterminer la conformité d'un produit ou de diagnostiquer une maladie par exemple. Face aux besoins et aux demandes de plus en plus importantes d'analyses plus rapides, fiables, simples à mettre en œuvre et transportables, le développement de nouvelles techniques s'avère être une nécessité. Les techniques classiques d'analyses chimiques comme la chromatographie, la spectrométrie de masse sont des techniques très précises et fiables. Cependant elles sont souvent laborieuses et coûteuses et surtout nécessitent des personnes qualifiées. C'est pourquoi de nouvelles techniques telles que les biocapteurs/biopuces et nez/langues électroniques (eN/eT) ont été développées [1-3].

1.1 Comparaison biocapteurs/biopuces et nez/langues électroniques

Les biocapteurs et les biopuces se composent d'un récepteur individuel ou d'un réseau de récepteurs, élément de reconnaissance du phénomène à mesurer et d'un transducteur qui convertit le signal de reconnaissance en un signal physique mesurable. Ces systèmes sont basés sur le principe de reconnaissance clé-serrure, c'est à dire que chacun des récepteurs est conçu pour reconnaître de manière spécifique un analyte dit cible comme l'illustre la Figure 1-1a. Chaque récepteur permet de générer une information pertinente vis-à-vis de la cible, même si parfois il arrive que des cibles se lient de manière non spécifique, le signal est alors considéré comme un bruit. Ces dispositifs par leur grande diversité trouvent de multiples applications dans le domaine médical (suivi de la glycémie et criblage des biomarqueurs *etc.*) [4-11], dans le domaine environnemental (détection de pesticides et de métaux lourds *etc.*) et dans le domaine agroalimentaire pour la sécurité alimentaire (détection de mycotoxines, d'éléments pathogènes *etc.*).

Cependant ces systèmes nécessitent l'élaboration d'un récepteur spécifique pour un analyte d'intérêt qu'il n'est pas toujours possible d'obtenir de manière naturelle ou par voie synthétique. Il est donc encore plus difficile d'élaborer un système permettant de réaliser l'étude d'un milieu complexe contenant plusieurs centaines de molécules. L'émergence de nouvelles technologies comme les nez et langues électroniques s'est avérée être une alternative prometteuse lorsqu'une analyse composant par composant n'est pas nécessaire comme pour le contrôle qualité dans le domaine de l'agroalimentaire. En effet dans le cas d'une analyse

globale, la simple comparaison avec l'échantillon de référence est suffisante pour établir rapidement les premiers tests de conformité.

Ces nouveaux systèmes que sont les nez et langues électroniques s'inspirent du goût et de l'olfaction des mammifères et se basent sur la réactivité croisée. Les eN/eT représentent un système de multicapteurs composé d'un grand nombre de récepteurs à faible sélectivité utilisant des méthodes mathématiques avancées ; soit pour définir les motifs de reconnaissance associés à chaque cible, soit pour analyser les signaux de manières statistiques par les analyses multivariées comme l'Analyse en Composantes Principales (PCA en anglais pour « Principal Component Analysis ») ou le réseau de neuronal artificiel (ANN « Artificial Neural Network »).

Dans ces dispositifs, chaque récepteur peut reconnaître plusieurs cibles avec des affinités variables (différentielles) et une même cible peut être reconnue par plusieurs récepteurs, comme l'illustre la Figure 1-1 [12]. A la différence des biocapteurs, les récepteurs mis en jeu se basent sur la réactivité croisée, ils ne possèdent donc ni spécificité, ni sélectivité (affinité) particulière pour une molécule donnée. Par conséquent le signal généré par un seul récepteur n'est pas pertinent pour la cible. En revanche, l'ensemble des signaux générés par tous les récepteurs constitue un motif de reconnaissance ("pattern recognition") qui est caractéristique de la cible et qui peut donc être considéré comme une empreinte digitale [13-16]. Chacune de ces « empreintes digitales » peut par conséquent être utilisée pour l'analyse, l'identification et la classification des cibles. Il est ainsi possible de réaliser l'étude de cibles uniques, c'est-à-dire composées d'un seul analyte, mais aussi de mélanges complexes contenant plusieurs analytes [17, 18].

L'avantage principal des eN/eT est de pouvoir contourner par l'approche de récepteurs à réactivité croisée, les difficultés des méthodes classiques liées à la conception de récepteurs très spécifiques et sélectifs souvent laborieux et coûteux à fabriquer. Ces systèmes représentent des méthodes complémentaires voire alternatives particulièrement adaptées à l'analyse de milieux complexes. Les premiers travaux de Persaud de l'Université Warwick (Angleterre) en 1986, ont contribué à l'essor et aux développements des nez et langues électroniques [19]. Depuis ces trois dernières décennies et pour répondre aux besoins grandissants de détection et d'analyses de milieux complexes, divers systèmes ont été réalisés et utilisés dans des domaines très variés. Afin d'illustrer les applications potentielles et prometteuses des eN/eT, le paragraphe suivant résume quelques principes d'utilisation

Dans le secteur environnemental, les nez et langues électroniques transportables et capables d'analyser en temps réel des échantillons gazeux ou liquides ont été utilisés pour la surveillance de la qualité de l'eau et de l'air (molécules toxiques ou dangereuses) [20-22]. Ils jouent

également un rôle dans la sécurité des populations par la détection de substances explosives [23, 24], d'armes biologiques ou chimiques.

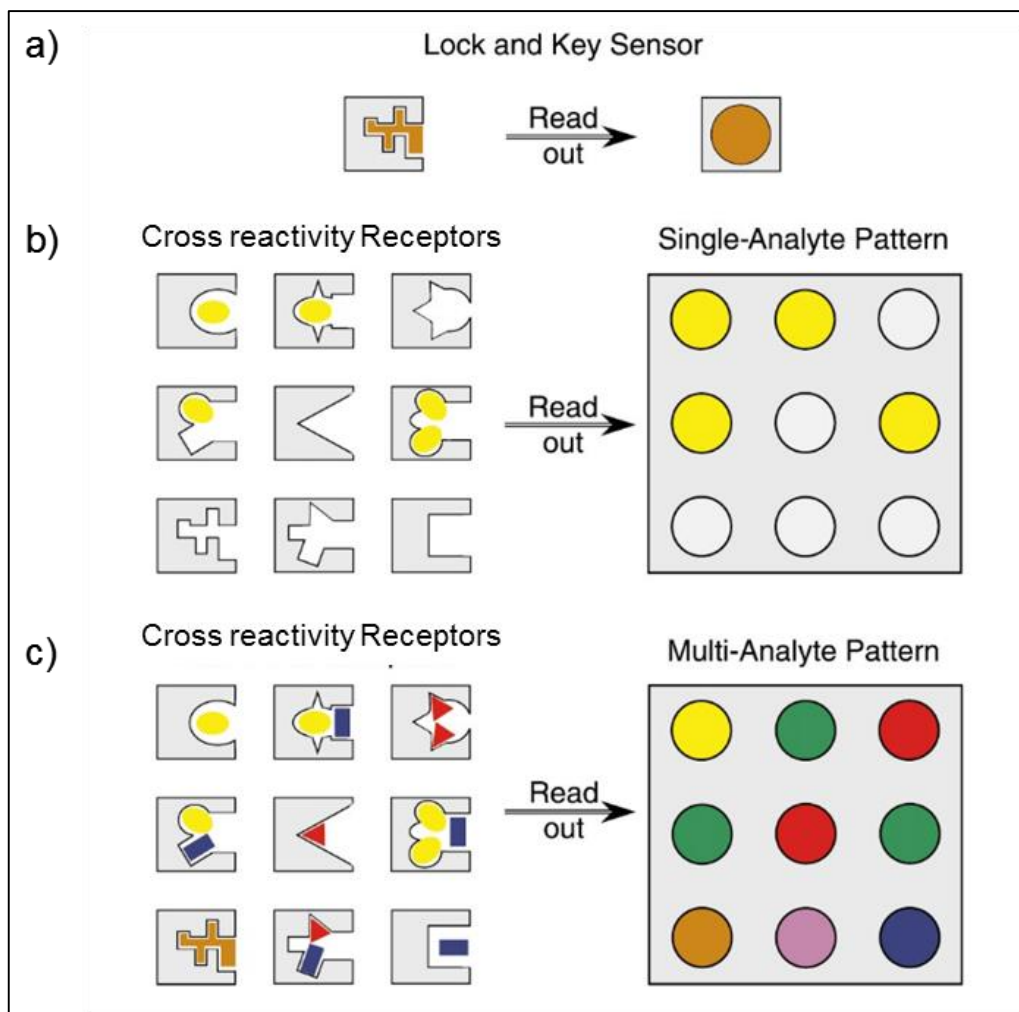


Figure 1-1 : Représentation schématique des interactions cibles-sondes.

- a) Représentation d'une interaction spécifique basée sur le principe clé-serrure.
- b) un réseau de récepteurs à réactivité croisée où une cible peut interagir avec différents récepteurs. L'identification résulte des réponses obtenues à partir de l'ensemble du réseau de récepteurs.
- c) Représentation d'un réseau de récepteurs à réactivité croisée pouvant interagir avec différentes cibles d'un échantillon complexe. Les résultats de l'identification représentent les réponses obtenues à partir de l'ensemble du réseau de récepteurs [18].

Dans le secteur industriel, les eN/eT peuvent être employés pour le contrôle des micro-organismes [25] ou des produits chimiques dangereux rejetés par les eaux industrielles [26]. Ils peuvent être utilisés pour les contrôles des procédés de fabrication dans les industries pharmaceutique [27] ou alimentaire [28] mais aussi comme systèmes de contrôle qualité afin d'évaluer la maturation, la fraîcheur de certains produits [29-32], leurs vieillissements [33, 34] ou pour détecter d'éventuelles contaminations bactériennes et l'altération du produit [35]. Les nez et langues électroniques peuvent être également employés comme capteurs d'odeurs et de goûts lors des tests organoleptiques par exemple lors de la formulation ou de la dégustation de

produits comme le café [36], le lait [37] ce qui éliminerait le facteur de subjectivité introduit lors des tests humains [16].

Dans le secteur médical les nez électroniques peuvent être utilisés comme des méthodes simples, non invasives de dépistages ou de diagnostics de maladies par la reconnaissance des odeurs caractéristiques dans l'air expiré [38, 39]. Diverses études ont montré leurs applications potentielles pour la détection des cancers du cerveau [40], du poumon [41, 42], de la prostate et des ovaires [43] mais aussi pour le diagnostic du diabète [44, 45], des maladies comme l'Alzheimer et la maladie de Parkinson [46] ou encore des maladies respiratoires comme l'asthme, la mucoviscidose [47] ou la tuberculose [48]. L'identification de bactéries est également possible par ce système [49, 50] ce qui permettrait de cibler le traitement médical nécessaire et de l'ajuster si besoin [51, 52].

1.2 Sources d'inspiration : systèmes gustatif et olfactif humain

Afin de mieux comprendre les systèmes de nez et langues électroniques et par conséquent d'améliorer la conception de ces systèmes, nous allons dans cette partie décrire les deux systèmes gustatif et olfactif.

1.2.1 Le système gustatif humain

Le goût est un système sensoriel qui permet de détecter et d'identifier des éléments ingérés. Cinq saveurs principales sont actuellement décrites: le sucré ; le salé ; l'amer ; l'acide et « l'umami » (savoureux) mais elles peuvent se combiner entre elles pour former d'autres saveurs plus complexes [53]. Les récepteurs gustatifs à la base de la perception du goût sont principalement situés sur la langue dans les 5000 papilles caliciformes ; filiformes ; fongiformes et foliées (présentées dans la Figure 1-2). Situés au niveau des replis des papilles, les bourgeons du goût constituent des amas cellulaires contenant entre 50 et 100 cellules gustatives neuro-épithéliales.

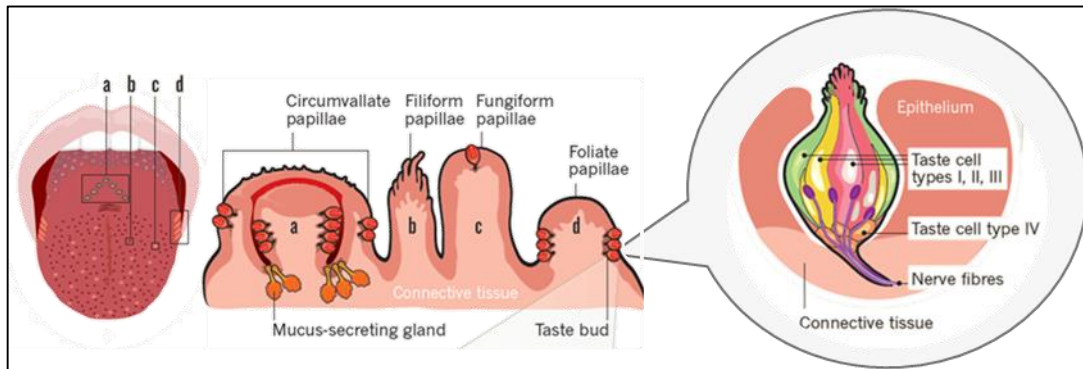


Figure 1-2: Représentation schématique des quatre différentes papilles dites papilles caliciformes ; filiformes ; fongiformes et foliées. Le bourgeon gustatif est plus particulièrement représenté avec ces 4 types cellulaires ainsi que sa connexion aux fibres nerveuses [54]

Dans ces bourgeons gustatifs ont été dénombrées 4 types de cellules différentes :

- Les cellules gliales (type I) sensibles aux substances salées.
- Les cellules réceptrices du goût (type II) sensibles aux substances du sucré, de l'amer et de « l'umami ». Elles possèdent des récepteurs associés aux protéines G.
- Les cellules présynaptiques (type III) sensibles aux substances acides.
- Les cellules basales (type IV) qui sont peu différenciées et qui représentent les précurseurs des trois autres types cellulaires.

Le goût salé est reconnu par des récepteurs ioniques de l'épithélium composant un canal spécifique et permettant de détecter la présence notamment de sodium [55, 56]. Les molécules acides sont également détectées par des récepteurs ioniques notamment lors de la présence de protons [53]. Les substances sucrées, amères et « umami » sont quant à elles détectées par des récepteurs du goût (Taste Receptors TR). L'amertume est reconnue par la famille des récepteurs T2R qui compte environ 25 récepteurs connus chez l'Homme, tandis que les récepteurs hétérodimériques T1R1/T1R3 et T1R2/T1R3 reconnaissent respectivement les substances « umami » (comme le glutamate) et les molécules sucrées (comme les sucres, les acides aminés ou les protéines sucrées) (Figure 1-3) [57-59]. L'activation de ces récepteurs couplés aux protéines G lors de la reconnaissance des molécules, augmente le taux de calcium ce qui génère une modification des canaux ioniques et la sécrétion d'ATP afin de dépolariser les cellules et de transférer l'information au cerveau.

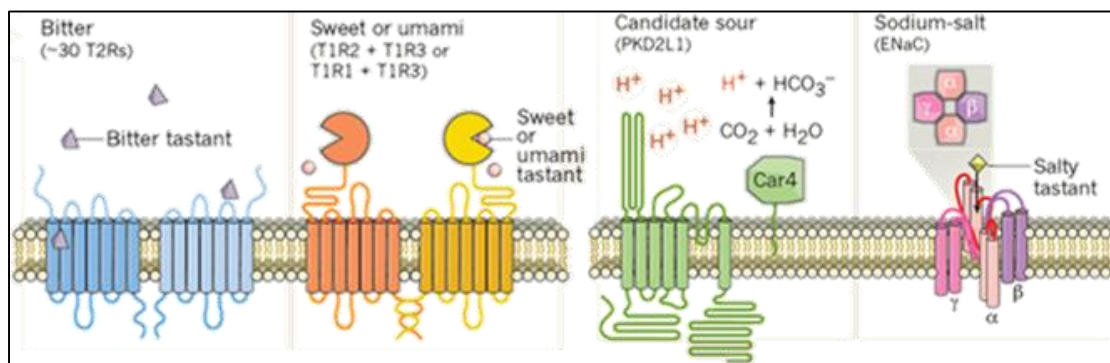


Figure 1-3 : Représentation des structures des différents types de récepteurs mis en jeu lors de la reconnaissance des saveurs principales : amer ; sucré ; « umami » ; acide et salé [54].

1.2.2 Le système olfactif humain

Le système olfactif humain se caractérise par sa très grande sensibilité et son pouvoir de discrimination beaucoup plus important que le système gustatif. En effet l'être humain est capable de discriminer environ 10 000 odeurs. De plus une récente étude a révélé la possibilité de discriminer plus de 10^{18} stimuli olfactifs [60].

L'olfaction est un système complexe qui lie la biologie, la physico-chimie mais aussi la cognition (mémoire et processus d'apprentissage). Lors de l'inhalation de l'air par voie directe (inspiration) ou rétronasale, des protéines contenues dans le mucus de la cavité nasale lient les molécules odorantes [61-63]. Ces protéines de liaisons aux molécules odorantes (OBP, pour « Odorant Binding Proteins ») transportent alors les molécules odorantes vers les récepteurs olfactifs (OR) transmembranaires situés dans les neurones olfactifs [64]. L'information de reconnaissance est alors transférée au bulbe olfactif, puis au cerveau qui reconnaît et définit l'odeur (cognition), comme l'illustre la Figure 1-4.

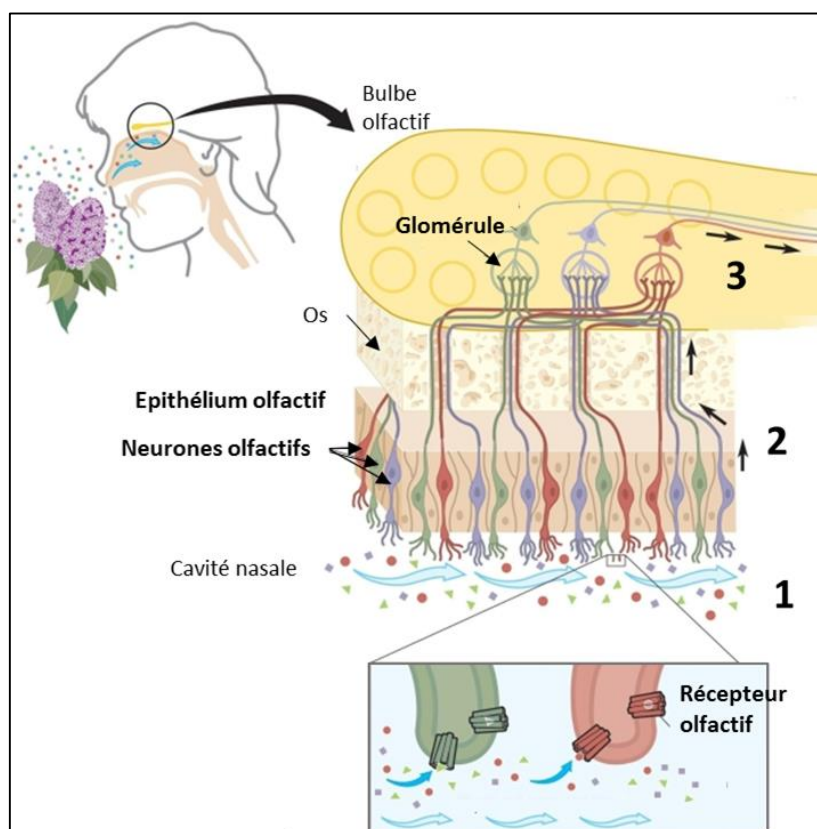


Figure 1-4 : Schéma de l'anatomie du système olfactif humain. 1-Les molécules odorantes se lient aux récepteurs olfactifs. 2- Les neurones olfactifs envoient des signaux vers le bulbe olfactif. 3-Dans les glomérules, les signaux sont transmis à des neurones relais vers le cerveau. Adaptation: Nobelprize.org

Les OBP se lient de façon réversible à différentes classes de molécules odorantes mais sans spécificité particulière. Ces protéines présentent dans leur structure, une cavité hydrophobe qui permet le transport des molécules odorantes (souvent hydrophobes dont la masse est généralement inférieure à 300 g.mol^{-1}) au travers du mucus nasal jusqu'aux récepteurs olfactifs [65, 66]. Les OR très sélectifs réalisent ensuite la reconnaissance des molécules odorantes. Ils possèdent une structure protéique complexe élucidée en 1991 par Richard Axel et Linda Buck. De petites tailles, ces récepteurs se composent de 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G [67]. La particularité de ces OR est d'être situés sur la membrane des cils des neurones sensoriels olfactifs qui baignent dans le mucus (Figure 1-4). Les neurones olfactifs considérés comme les cellules réceptrices sensorielles possèdent à leur autre extrémité, un axone projeté vers le bulbe olfactif au niveau de glomérules, premiers relais de la perception olfactive du cerveau comme l'illustre la Figure 1-4 [67]. L'association d'un récepteur avec la molécule odorante, génère une cascade de signalisations intracellulaires dans le neurone qui transforme alors la reconnaissance (interaction) en un signal électrique (dépolérisation cellulaire) transmis à l'axone puis au cerveau [68]. Des études ont établi par la suite, qu'un neurone olfactif n'exprime à la surface de ses cils qu'un seul type de récepteurs olfactifs et que les neurones portant le même récepteur olfactif projettent leurs axones seulement vers un ou

deux glomérules communs [12]. La reconnaissance des odeurs peut donc être comparée à la projection d'une image olfactive au sein du bulbe olfactif où chaque pixel correspond à un récepteur olfactif donné [68].

Comme nous l'avons mentionné précédemment le fonctionnement du système olfactif humain est basé sur la réactivité croisée comme le montre la Figure 1-5.

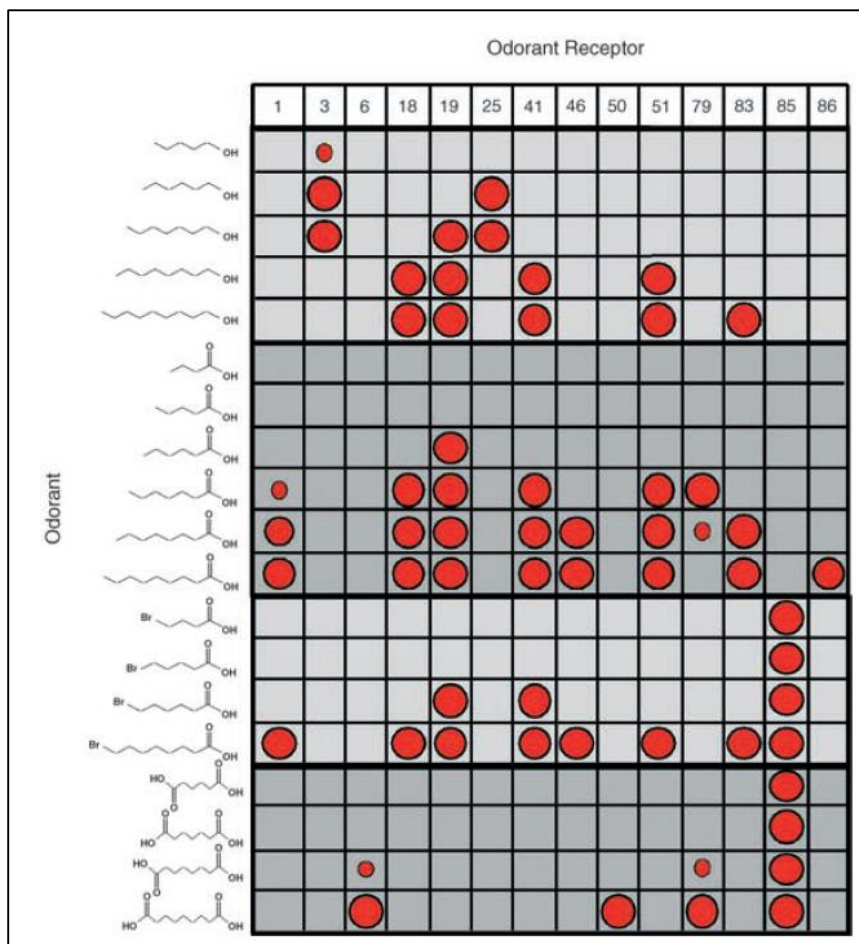


Figure 1-5: Représentation du principe de reconnaissance combinatoire du système olfactif [64].

En général :

- un récepteur olfactif peut reconnaître avec des affinités variables différentes molécules odorantes
- une molécule odorante peut être reconnue par différents OR
- La combinaison de l'ensemble des signaux générés par les OR constitue un motif de reconnaissance qui permet la reconnaissance des odeurs.

Ainsi plus le nombre de récepteurs impliqué dans la reconnaissance des odeurs est important, plus la performance d'identification augmente. A ce jour on dénombre 396 types de récepteurs olfactifs différents identifiés chez l'Homme contre 811 chez le chien [64, 69]. Ce nombre de récepteurs important chez le chien lui permet de reconnaître un plus grand nombre d'odeurs. Cependant la différence entre le système olfactif canin et humain réside également dans la

superficie d'épithélium olfactif 30 fois plus importante chez le chien que chez l'Homme où il est d'environ 5 cm² [69].

Dans ce manuscrit, le terme nez électronique concerne les systèmes multicapteurs basés sur le principe de réactivité croisée qui sont utilisés pour l'analyse de milieux gazeux tandis que les langues électroniques sont dédiées à l'étude des milieux liquides. Cependant il existe dans la littérature deux types de langues électroniques inspirés soit du système gustatif soit du système olfactif humain.

1.3 Conceptions des eN/eT en analogie avec les systèmes olfactifs

Lors de la conception des systèmes de nez et langues électroniques, chaque élément peut être comparé à un constituant du système olfactif. Les neurones olfactifs représentent le capteur composé de sa partie sensible avec les récepteurs olfactifs (OR) associé de manière directe au système de transduction initial (axone). Le bulbe olfactif constitue le système de prétraitement de l'information mais le cerveau quant à lui compose le système d'intégration, d'analyse et d'interprétation du signal comme le décrit la Figure 1-6. Nous pouvons donc décrire les nez et langues électroniques comme des systèmes se composant typiquement de trois éléments principaux :

- Un réseau de récepteurs à réactivité croisée qui soit adapté aux échantillons à étudier
- Un système de transduction permettant de convertir l'événement de reconnaissance en signal physiquement mesurable
- Un ensemble d'analyses de données pour générer le motif de reconnaissance et/ou identifier et classer les échantillons par l'intermédiaire de méthodes mathématiques (algorithmes, analyses en composantes principales *etc...*)

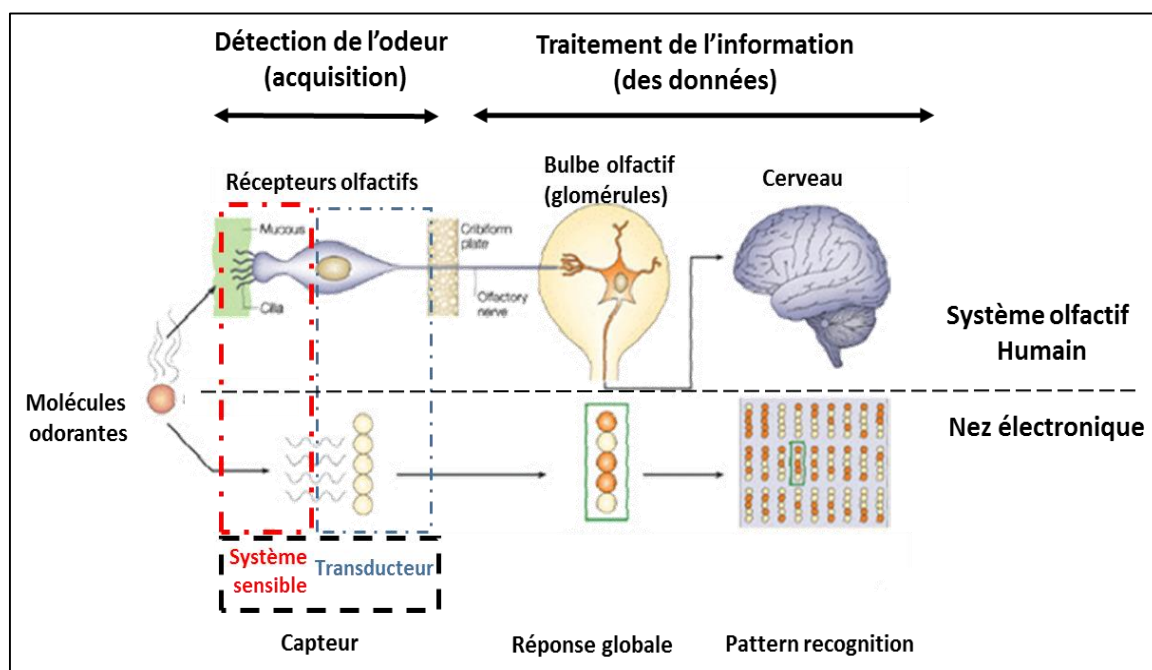


Figure 1-6 : Analogie entre le système olfactif humain et les systèmes de nez et langues électroniques [70].

Tout comme le système humain, les nez et langues électroniques nécessitent une phase d'apprentissage pour constituer une base de données (e.g. bibliothèque des odeurs). Il est ensuite possible de comparer les échantillons nouveaux avec les données antérieures afin de pouvoir les analyser, les identifier et les classer mais aussi d'incrémenter la base de données lors de l'analyse d'un nouvel échantillon. Les méthodes d'apprentissage représentent des méthodes mathématiques et statistiques pour traiter de manière informatique des données.

En général lors de traitements de données on réalise dans un premier temps l'analyse de l'ensemble des signaux afin de constituer le motif de reconnaissance. Il est représenté le plus souvent sous forme graphique par un histogramme ou par une représentation sous forme de radar (toile d'araignée) (Figure 1-7). **A noter que les données dans ce mode de représentation ne sont pas corrélées entre elles.**

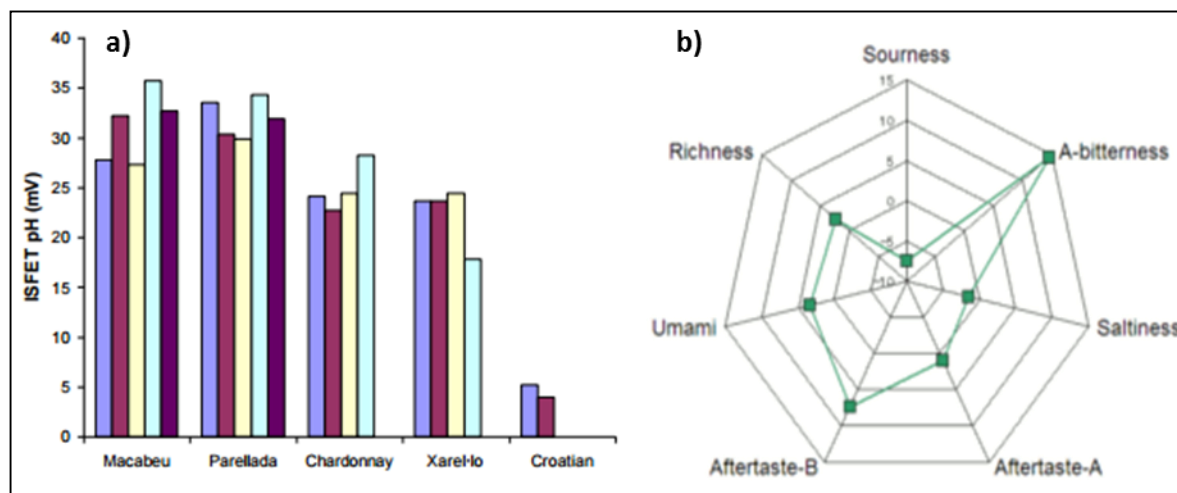


Figure 1-7 : a) Représentation en histogramme d'une analyse de 5 vins par une langue électronique composée de 5 transistor à effet de champ sélectif aux ions (pH ISFET) (parme : Na^+ , magenta : K^+ , jaune : Ca^{2+} , cyan : Cl^- , pourpre : NO_3^-) [71]. b) Représentation en radar des saveurs décrites par une bière analysée par une langue électronique (capteur de goût) [72].

Cependant ces résultats doivent être comparés à un ou des échantillon(s) de référence, ce qui complexifie alors l'analyse visuelle [35]. C'est pourquoi d'autres méthodes sont utilisées afin d'établir quantitativement les variations observées et de classifier les cibles étudiées : c'est le processus d'apprentissage qui peut être supervisé ou non [73].

Par exemple dans certains cas d'analyses lorsque l'on cherche à identifier un échantillon sans informations préalables, il est possible de réaliser une analyse multivariée. L'Analyse en Composantes Principales (PCA) est une de ces méthodes exploratoires et non supervisée couramment utilisée. La PCA permet de faire ressortir les relations pouvant exister entre les différentes données et en tirer une information statistique qui permet de décrire de façon plus succincte les principales informations contenues dans ces données. Nous pouvons ainsi regrouper les données de même famille sous forme de cluster et les classifier [1, 73]. Les données d'origines sont donc représentées de manière plus pertinente en considérant les variables de manière équivalente (sans pondération) [52].

A l'inverse, il existe des méthodes supervisées qui développent un modèle mathématique pour prédire l'appartenance d'un échantillon à un groupe (appelé aussi cluster) prédéfini. Contrairement à la PCA, l'Analyse Linéaire Discriminante (LDA) réduit le nombre de dimensions analysées tout en préservant au maximum les classes. Cette méthode réalise une recherche des axes générant un espace tel que la projection des données dans l'espace engendrée par ces axes permette d'obtenir une meilleure séparation des classes. Cette approche est particulièrement utile dans les cas où les fréquences interclasses sont inégales [68]. La méthode de Réseau Neuronal Artificiel (ANN « Artificial Neural Network ») se base, quant à elle sur une version simplifiée et abstraite du processus de cognition du cerveau humain. Pour cela le mode d'analyse se compose d'un ensemble d'algorithmes (fonctions mathématiques)

interconnectés et fonctionnant en parallèle. Cette méthode reconstitue donc le système nerveux humain où les neurones sont remplacés par des algorithmes, comme le montre la Figure 1-8 [1, 74]. Chaque neurone est associé à une pondération afin d'effectuer le processus d'apprentissage. Pour définir le système de reconnaissance le mieux adapté, il est nécessaire d'avoir un nombre de données initiales suffisant. Le système est de plus évolutif et utilise les données des expériences antérieures afin d'établir le bon réseau pour la reconnaissance de substances olfactives inconnues par exemple [35, 75].

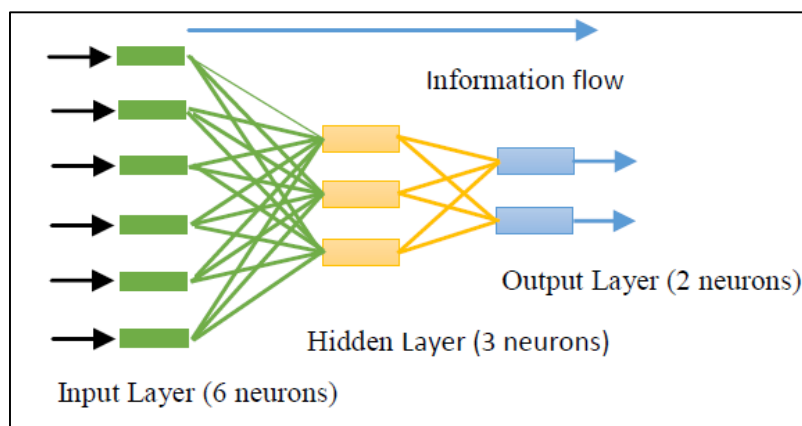


Figure 1-8 : Représentation de l'architecture du réseau neuronal artificiel pour établir un système de reconnaissance. Les 6 neurones d'entrée représentent les 6 récepteurs différents utilisés tandis que les neurones de sortie permettent d'identifier l'échantillon étudié [76].

Parfois l'utilisation de prétraitements de données telles que la moyenne, la normalisation ou le lissage de données permet d'améliorer les performances de l'analyse réalisée [74]. Au cours de cette thèse nous avons réalisé l'interprétation de nos résultats moyennés par l'analyse en composantes principales afin de classifier différents échantillons.

1.4 Etat de l'art des langues électroniques

Comme nous l'avons introduit précédemment, la conception d'une eT performante réside dans le capteur utilisé qui se compose d'éléments sensibles (récepteurs) et d'un système de transduction devant être adapté au système étudié. Dans cette partie de l'état de l'art, nous décrirons comment des systèmes de langues électroniques ont été conçus en adéquation avec les applications visées, et plus particulièrement pour l'élaboration des matériaux sensibles et le choix du transducteur.

La principale caractéristique du matériel sensible utilisé est de posséder une faible sélectivité mais une réactivité croisée importante. Cela lui permet de répondre à un grand nombre d'analytes avec différentes affinités et de générer une réponse stable et reproductible. Le choix d'un transducteur dépend de l'application visée mais aussi du type des interactions mises en

jeu lors de la reconnaissance. Pour répondre à l'éventail d'applications potentielles des langues électroniques, divers systèmes de transductions ont été utilisés. Les principaux transducteurs peuvent être regroupés en trois catégories à savoir ceux mettant en jeu des variations électrochimiques, massiques et optiques comme le montre la Figure 1-9.

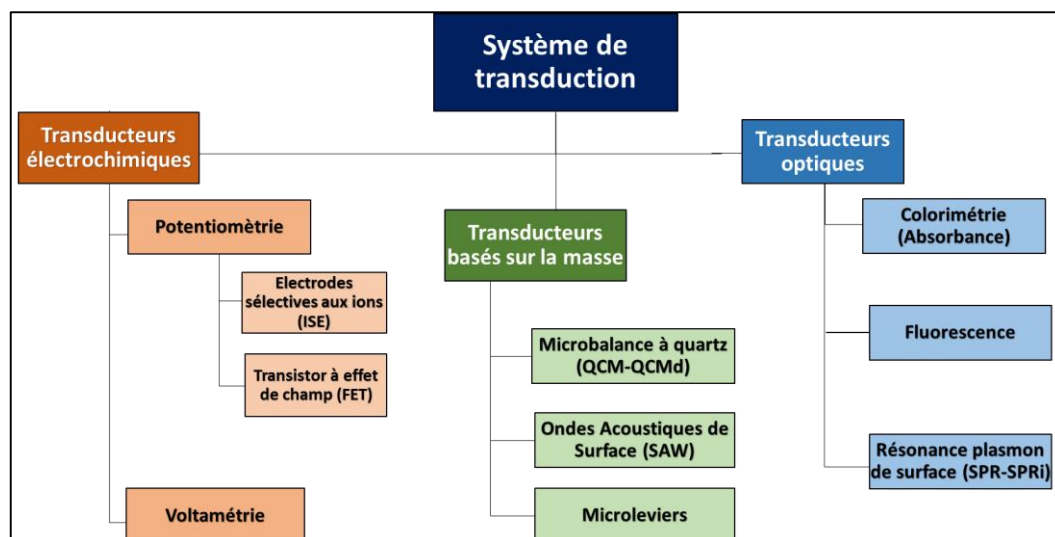


Figure 1-9 : Classification des principaux systèmes de transductions utilisés pour les systèmes de nez et langues électroniques.

1.4.1 Langues électroniques utilisant des transducteurs électrochimiques

Les analyses électrochimiques se basent sur la détection d'entité(s) électrochimique(s) généralement à l'aide d'un montage à trois électrodes : l'électrode de mesure (ou de travail) ; l'électrode de référence et une contre-électrode appelée aussi électrode auxiliaire, comme le montre la Figure 1-10. Les principales techniques électrochimiques utilisées sont la potentiométrie et la voltampérométrie.

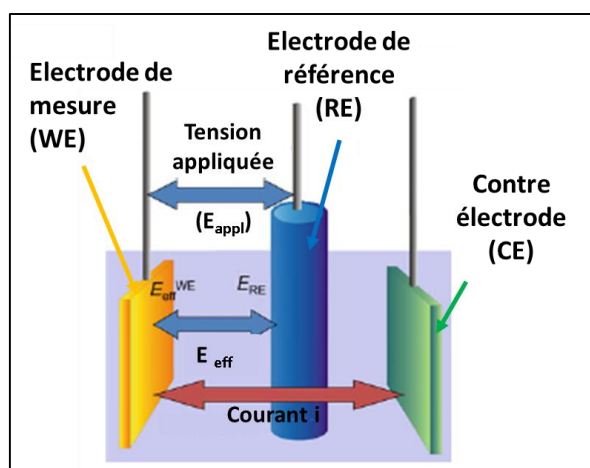


Figure 1-10 : Schéma d'une configuration à 3 électrodes pour la mesure potentiométrique ou voltamétrique [25].

1.4.1.1 Systèmes basés sur la potentiométrie

La potentiométrie mesure dans le système de eN/eT, la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence immergées dans une solution parcourue par un courant connu. Le potentiel mesuré est ici fonction de la présence ou non d'espèces capables d'accepter ou de donner des électrons. Cette méthode électrochimique est majoritairement utilisée comme système de transduction pour son faible coût et sa fabrication simple. Les électrodes de mesure utilisées sont sélectives par rapport aux ions grâce à l'utilisation par exemple de membranes. Ces membranes sélectives aux ions permettent de détecter de manière ciblée un seul ion dans un mélange. Dans le cas de ces électrodes, l'ion peut pénétrer dans la membrane et modifier les caractéristiques électrochimiques de cette dernière, ce qui génère la variation de potentiel. Cependant même si cette membrane est dite sélective à un ion, elle n'est pas pour autant spécifique comme le montre le Tableau 1-1. La membrane présente donc une grande sensibilité pour l'ion ciblé mais peut également réagir avec des ions perturbateurs aux propriétés chimiques ou aux structures semblables comme l'ion hydroxyde (OH^-) perturbateur de la mesure des ions fluorures (F^-) [77].

Tableau 1-1 : Descriptif des types de membranes et des ions mesurés pour les électrodes ioniques spécifiques.

Types de membranes	Caractéristiques	Ions mesurés
Membrane en verre	Structure basique en verre de silicate avec des interstices	H^+ et Na^+
Membrane cristalline	Contenant des espaces définis pour l'ion à mesurer	F^- ; Cl^- ; Br^- ; I^- ; CN^- ; SCN^- ; S^{2-} ; Ag^+ ; Cu^{2+} ; Cd^{2+} ; Pb^{2+}
Membrane polymère	Contenant une molécule (= ionophore) qui ne forme de lien qu'avec l'ion à mesurer	Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+} ; NO_3^- ; BF_4^-

On peut citer à titre d'exemple le premier système de eT développée par l'équipe du professeur Koto de l'Université de Kyushu (Japon) pour la reconnaissance du goût. Ce dispositif utilise des membranes lipidiques artificielles comme matériaux sensibles, constituées de manières variables afin de correspondre aux différents goûts et de pouvoir discriminer au minimum les 5 saveurs principales [78, 79]. Lors d'interactions électrostatiques ou hydrophobes entre les molécules analysées et la membrane lipidique de chaque capteur, le potentiel de la membrane est modifié [80] comme l'illustre la Figure 1-11. Ce système commercialisé par la société Intelligent Sensor Technology Inc. (INSENT) se base sur 8 capteurs permettant de reconnaître

l'aigreur, la salinité, l'astringence, le sucré, « l'umami » et 3 capteurs d'amertume spécifiques à certains ions, schématisés dans la Figure 1-11.

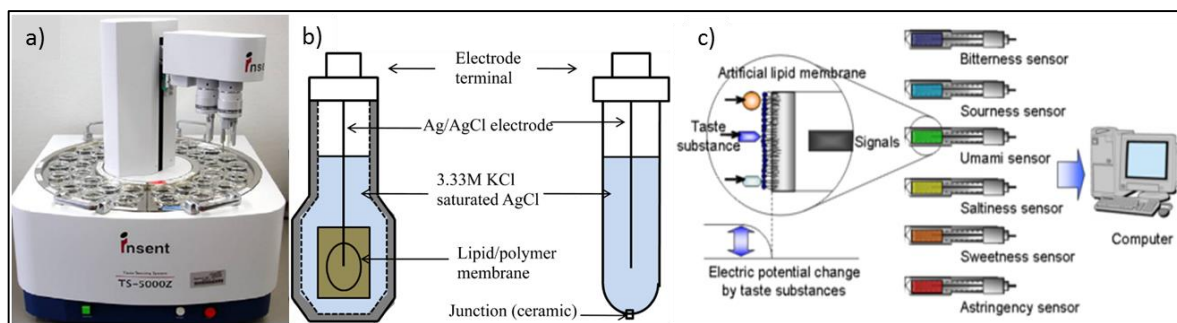


Figure 1-11 : a) Photographie du système TS-500Z de la société INSENT Inc. (Japon) [81].
b) Schéma de montage du système électrochimique.
c) Différentes membranes lipidiques utilisés dans le système [80].

Ce dispositif inspiré du système gustatif humain, est utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme capteur de goût pour analyser des boissons comme la bière [72, 78], le thé vert [82, 83], le café [36], la sauce soja [84]. Les motifs de reconnaissance générés par le système sont représentés sous forme de toile d'araignée et permettent de différencier les échantillons en fonction des saveurs (Figure 1-12).

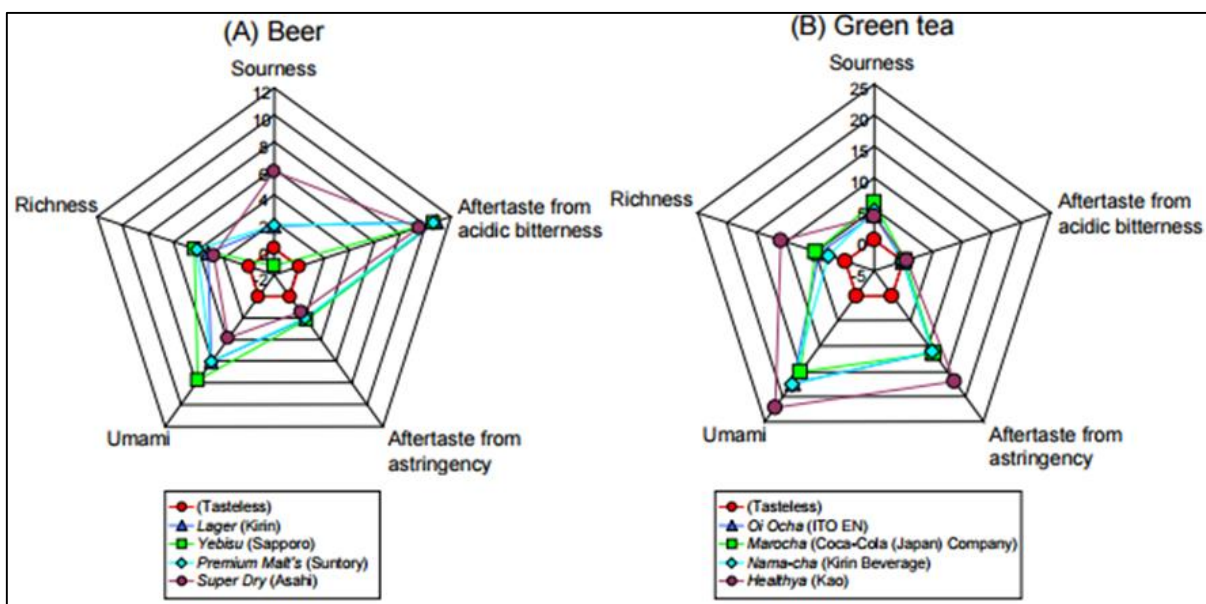


Figure 1-12 : Représentation graphique de différentes solutions de bière et de thé vert. Une solution de référence (KCl 30 mM et acide tartrique 0,3 mM) utilisée comme échantillon insipide (sans saveur) pour effectuer la mise à zéro du système [80].

De plus ce système a été également utilisé dans le secteur pharmaceutique pour déterminer et évaluer l'amertume des médicaments ainsi que la capacité des molécules comme le saccharose ou l' α -cyclodextrine à supprimer cette sensation d'amertume [81, 85].

1.4.1.2 Systèmes basés sur les transistors à effet de champs

Les transistors à effet de champs (FET) se constituent d'un semi-conducteur, d'un isolant et d'une grille métallique sensibles aux charges [7]. Ce type de transistor (Figure 1-13) est couramment nommé MOSFET pour « Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor », en raison de l'utilisation d'un oxyde comme isolant. En règle générale, on distingue le substrat de silicium dopé *P*, déficitaire en électrons, dans lequel sont inclus deux zones dopées *N*, c'est-à-dire riches en électrons, permettant de réaliser les contacts ohmiques de la source et du drain. La grille métallique quant à elle, surmonte la couche d'oxyde de silicium déposée au-dessus du substrat entre les deux contacts. Le courant électrique qui circule au sein de ce type de transistor, entre une source et un drain, est régulé par l'intermédiaire de la tension appliquée sur la grille. La sélectivité du système est obtenue grâce aux modifications de sa surface par une mince couche d'oxyde de différents matériaux (SiO_2 , TiO_2 par exemple), de membranes organiques ou d'un film de polymère. L'interaction entre les molécules cibles et la surface de la grille modifie les propriétés de l'interface, ce qui conduit à une modification de la tension en fonction de la concentration de l'espèce à adsorber, et donc à une variation du courant du drain [86].

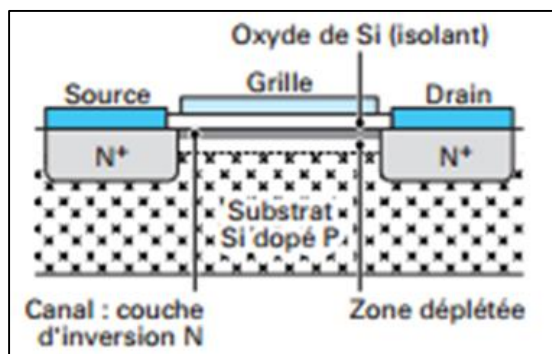


Figure 1-13 : Illustration schématique d'un transistor MOSFET [87].

Basé sur ce système de FET, la langue électronique Astree (Figure 1-14) a été développée et commercialisée par la société AlphaMOS (Toulouse), leader mondial dans le domaine des eN/eT. Leur système est composé de 7 capteurs qui comportent chacun une membrane organique spécifique qui interagit différemment avec les composés chimiques ioniques et neutres présents dans l'échantillon liquide. Toute interaction à l'interface de la membrane est détectée par le capteur et convertie en signal électronique. Ainsi 3 gammes de 7 capteurs ont été développées pour des applications respectives dans les domaines de l'alimentaire, de la pharmaceutique et de la mesure d'amertume des nouvelles molécules chimiques [81].

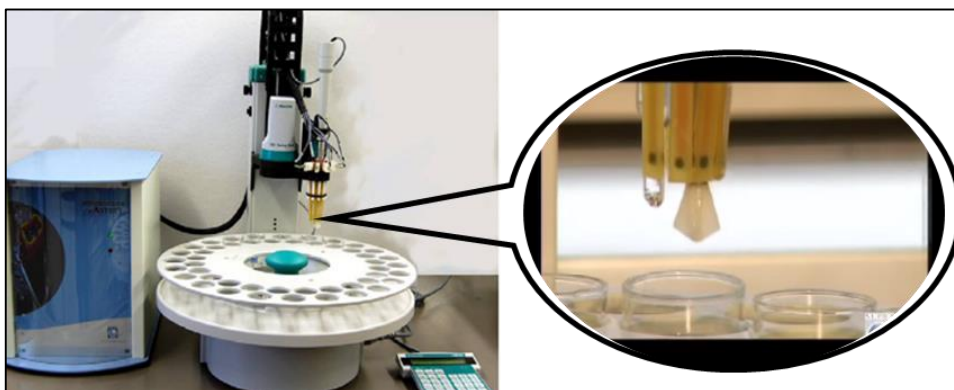


Figure 1-14 : Photographies du Système α Astree2 et de ses capteurs ChemFET développés par la société AlphaMOS (France) [81].

1.4.1.3 Systèmes basés sur la voltamétrie

Un autre système électrochimique couramment utilisé est la voltamétrie, grâce à sa simplicité, sa haute sensibilité, sa robustesse et son caractère versatile. Cette méthode est basée sur la mesure du courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés en solution sous l'effet d'une variation de potentiel contrôlée. Ce principe de transduction a été associé pour la première fois au système de nez et langues électroniques en 1997 par le professeur Winquist de l'Université de Linköping (Suède) et son équipe [88]. Initialement le système était composé d'électrodes de travail en or et en platine, d'une électrode auxiliaire et d'une électrode de référence [89]. Le système a ensuite évolué pour être composé de 5 électrodes de travail d'or, d'iridium, de palladium, de platine et de rhodium ; d'une électrode référence située au centre et d'une électrode auxiliaire en acier inoxydable (Figure 1-15). L'ensemble du système est relié à un potentiostat et à un ordinateur.

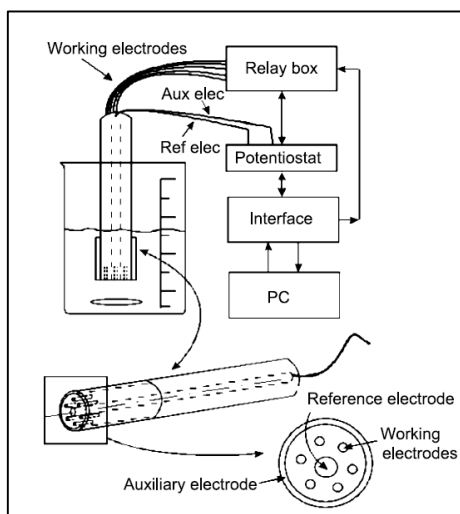


Figure 1-15 : Représentation schématique d'une langue électronique composée de 5 électrodes de travail, d'une électrode de référence en argent et d'une électrode auxiliaire en périphérie du système. L'ensemble du système est relié à un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface et d'un potentiostat [90].

Développé notamment dans le secteur de l'industrie agroalimentaire, ce système permet de différencier des thés [91, 92], des détergents [92] pour déterminer l'efficacité de rinçage mais aussi pour suivre le vieillissement du lait [93] ou encore surveiller la qualité de l'eau [21]. Ce système a également été utilisé pour différencier les vins rouge vieillis en fûts de chêne ou dans des cuves d'acier grâce à la formation de composés phénols différents en fonction des conditions de vieillissement [94].

En résumé ces systèmes électrochimiques bien qu'adaptés aux capteurs de goût restent limités à la détection d'échantillons contenant des ions ou des espèces chargées, ce qui restreint leur champ d'application. De plus, les matériels sensibles utilisés ne permettent pas d'obtenir une très bonne sélectivité, ce qui rend l'interprétation difficile pour l'analyse de milieux complexes.

1.4.2 Langues électroniques utilisant des transducteurs basés sur une variation de masse

Les systèmes de détection qui mettent en jeu une mesure d'une variation de masse, reposent sur l'effet piézo-électrique de certains matériaux comme le quartz. Ces composés piézo-électriques possèdent la capacité de se polariser électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique ou à l'inverse de se déformer sous l'application d'un champ électrique. Sur la base de ces propriétés, deux systèmes sont principalement utilisés : le système de microbalance à quartz (QCM) qui produit une onde se propageant au travers du quartz ; et le système d'onde acoustique de surface (SAW) qui produit une onde se déplaçant le long de la surface du capteur. En modifiant leur surface, ces matériaux sont rendus sélectifs et la reconnaissance sonde/cible est alors détectée via la variation de la fréquence de l'onde acoustique. De plus les deux systèmes QCM et SAW permettent de quantifier l'analyte fixé [15, 95]. La reconnaissance peut être mesurée qualitativement et quantitativement par ces dispositifs, c'est pourquoi nous allons à présent exposer plus en détails la QCM et la SAW.

1.4.2.1 Microbalance à quartz

Le système de microbalance à quartz permet d'étudier et de caractériser de manière physico-chimique les interactions entre des molécules et la surface fonctionnalisée du quartz. Le dispositif expérimental se compose d'une lamelle de cristal de quartz, l'élément piézo-

électrique, recouverte sur chacune de ses faces planes d'électrodes conductrices généralement en or (Figure 1-16). L'application d'un courant électrique par l'intermédiaire des électrodes, déforme le cristal qui se met à osciller avec une fréquence variable en fonction de l'épaisseur de la lamelle de quartz. La fonctionnalisation du quartz peut être faite par divers éléments afin de rendre la surface sensible ou chimiquement active en fonction de l'étude réalisée. Il est cependant nécessaire de définir préalablement les paramètres intrinsèques de la microbalance à quartz. Il est ainsi possible de relier proportionnellement la variation de la fréquence d'oscillation Δf à la variation de masse sur le quartz Δm , démontré en 1959 par Sauerbrey, par la relation suivante :

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}$$

Les paramètres intrinsèques de la microbalance à quartz sont f_0 : Fréquence de résonance (Hz) ; Δf : Variation de fréquence d'oscillation observée (Hz) ; Δm : Variation de masse (g) ; A : Aire active du cristal de quartz entre les deux électrodes (cm^2) ; ρ_q : Densité du quartz ($\rho_q = 2.643 \text{ g.cm}^{-3}$) ; μ_q : Module de cisaillement du quartz ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-2}$). Le facteur de la température est enregistré en parallèle des mesures puisque la célérité de l'onde générée par le cristal en dépend.

Il est également possible de qualifier les interactions de rigide ou de viscoélastique, par l'étude de la variation de dissipation (amplitude d'oscillation) en fonction de la variation de fréquence, c'est la QCM-D. Ainsi une dissipation importante du signal pour une faible variation de fréquence indique une viscoélasticité de la molécule, tandis qu'une faible dissipation sur une large gamme de fréquence indique une rigidité [96, 97].

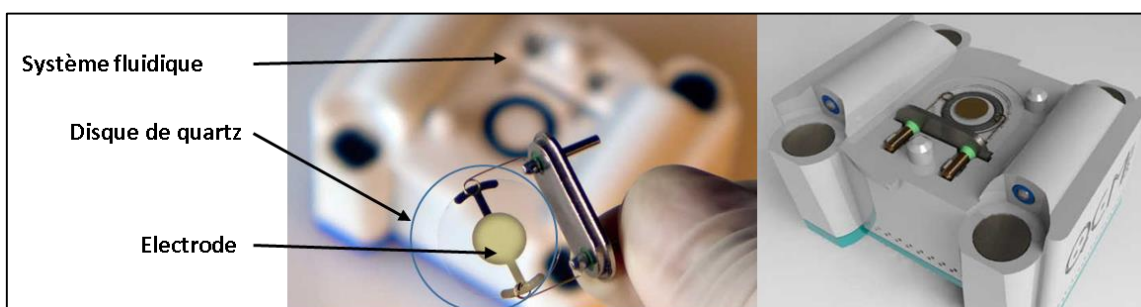


Figure 1-16 : Photographies d'une microbalance à quartz recouverte d'électrodes en or et du système fluidique associé. L'ensemble du système est commercialisé par la société Novaetech.

Ce système de transducteur a par exemple été utilisé afin de détecter des composés organiques volatiles (COV). L'équipe du professeur Di Natale de l'Université Rome Tor Vergata a ainsi couplé ce système de transduction avec des récepteurs composés de métallo-porphyrines d'une part et des peptides immobilisés sur des nanoparticules d'or d'autre part, à des fins de discrimination des arômes naturels ou artificiels de cacao présents dans les chocolats [98].

1.4.2.2 Ondes acoustiques de surface

Les capteurs d'ondes acoustiques de surface ou SAW, pour Surface Acoustic Wave, se basent sur la mesure des variations de la vitesse de propagation d'une onde acoustique. Le dispositif est constitué de deux paires d'électrodes inter-digitées (en peigne), composées d'un matériau piézo-électrique et séparées par un matériau sensible (Figure 1-17). Lorsqu'un champ électrique est appliqué, une des paires d'électrodes génère l'onde acoustique de surface (émetteur) tandis que la seconde paire d'électrodes détecte l'onde qui se propage (récepteur). L'amplitude et la vitesse de l'onde dépendent de la nature du milieu ce qui rend les ondes de surface très sensibles aux perturbations. Le matériau sensible, placé entre l'émetteur et le récepteur, peut donc être fonctionnalisé pour réagir de manière sélective avec les molécules cibles, ce qui modifie les propriétés de l'onde de surface. Les modifications de la vitesse et de la puissance acoustique sont proportionnelles à la quantité de ce qui a été adsorbé à la surface.

L'équipe du professeur Gardner de l'Université de Warwick (Royaume-Uni) a développé une eT basée sur ce principe sans utiliser de matériel sensible. Le dispositif a été utilisé comme capteur de goût pour classifier les substances chimiques correspondant aux 5 saveurs (sucré, salé, amer, acide, « umami ») [99].

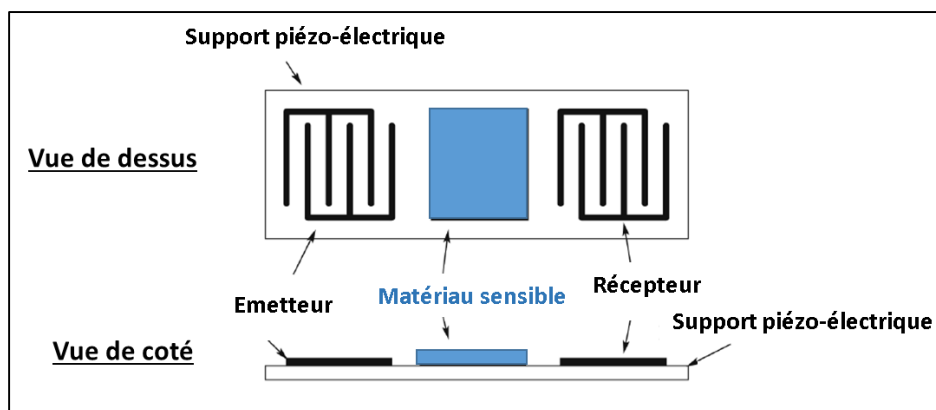


Figure 1-17 : Schéma d'un transducteur d'ondes acoustiques de surface [100].

1.4.2.3 Micro-leviers

La miniaturisation des systèmes de détection a notamment permis le développement de systèmes micro et nano électromécaniques, respectivement MEMS et NEMS. Appliqués aux nez et langues électroniques, ces systèmes se composent d'un ou plusieurs éléments mécaniques, qui s'associent en une partie fixe et une partie mobile partiellement détachée du support de type micro-leviers. Dans ce système de capteurs, une action mécanique comme une pression ou un dépôt de matière, génère la variation de fréquence de vibration ou le

déplacement de la partie mobile qui se traduit alors par un signal électrique. En règle générale cette transduction de signal est réalisée par les surfaces conductrices ou semi-conductrices qui composent le système. Cependant lorsqu'une fonctionnalisation de surface est réalisée (ajout d'un matériau adsorbant), la variation de masse est mesurée par la modification de fréquence de vibration de la partie mobile.

A titre d'exemple, la société APIX Technology développe depuis 2011 à Grenoble, un système d'analyseurs multigaz basé sur le couplage d'une chromatographie en phase gazeuse miniaturisée avec une puce silicium de quelques centimètres carrés constituée de capteurs de types NEMS. Cette technologie est plus compacte et moins coûteuse que les technologies actuellement commercialisées. De plus les applications visées par ce système peuvent être l'analyse des procédés de fabrication et de distribution industrielles comme la pétrochimie ou le gaz naturel, mais aussi l'analyse de l'air.

En résumé, les systèmes basés sur les variations de masse sont très efficaces pour des applications comme les nez électroniques. Cependant, leur utilisation comme système de transduction pour les eT est très peu mise en œuvre à ce jour en raison de la difficulté à créer un système multicapteurs, auquel s'ajoutent des problèmes de reproductibilité ainsi qu'au traitement des résultats complexes dus à la faible sélectivité d'absorption des récepteurs et d'un rapport signal sur bruit relativement faible.

1.4.3 Systèmes basés sur les transducteurs optiques

Les systèmes de transduction optique ont notamment été utilisés pour le développement des langues électroniques appliquées pour l'analyse de molécules biologiques ou chimiques pures ainsi que des milieux complexes. En général le système de transduction optique se compose d'une source de lumière générée par une diode laser ou par une diode électroluminescente (LED), d'éléments pour diriger la lumière et d'un photo-détecteur (photodiodes, caméra CCD). L'interaction entre l'échantillon et les récepteurs peut être détectée soit de manière directe par les modifications de propriétés optiques du récepteur, soit de manière indirecte par l'intermédiaire d'un marqueur optiquement actif. Dans les systèmes de nez et de langues électroniques, le signal de reconnaissance peut être mesuré par l'absorbance, la fluorescence, la polarisation et l'indice de réfraction [28]. Afin d'améliorer les performances pour les langues électroniques avec ces systèmes, diverses équipes de recherches américaines ont conçu et développé des matériaux sensibles dont les propriétés peuvent être adaptées et modulées très précisément en fonction des applications visées. Nous allons donc décrire dans cette partie quelques-uns de ces systèmes.

1.4.3.1 Absorbance

Le professeur Suslick et son équipe, de l'Université de l'Illinois, ont développé des multicapteurs colorimétriques. Ces derniers se composent d'un réseau de pigments chimiquement réactifs comme les métalloporphyrines, d'indicateurs de pH (acide et base) et d'indicateurs de polarité de la solution (solvatochrome) [101]. Ces divers pigments sont imprimés sur un support non poreux, le polyéthylène téréphtalate (PET), ci-dessous Figure 1-18.

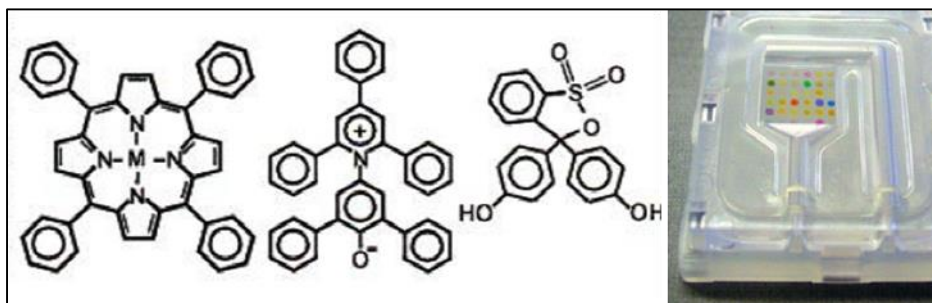


Figure 1-18 : La première molécule illustrée est un récepteur métalloporphyrine qui permet la reconnaissance de base de Lewis, le second identifie les modifications de polarité tandis que le dernier récepteur représenté est un indicateur de pH : le rouge de phénol [101]. A droite photographie du dispositif développé par le professeur Suslick [102].

L'interaction entre l'échantillon et les récepteurs colorimétriques induit le changement de coloration qui est mesurée avant et après exposition à la cible. Cela permet ensuite d'établir une image différentielle de réponse comme l'illustre la Figure 1-19.

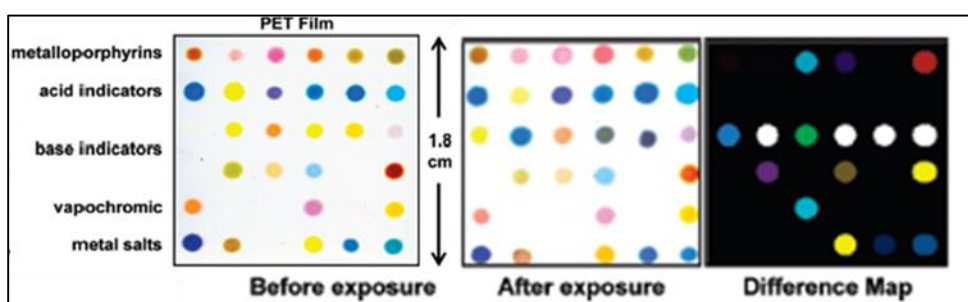


Figure 1-19 : Images du réseau de 36 récepteurs colorimétriques imprimés sur une surface hydrophobe de 6,25 cm², avant et après 2 minutes d'exposition à l'ammoniac à une température de 25°C, à un taux d'humidité de 50% et une concentration d'environ 300 ppm. L'image de droite représente l'image différentielle générée lors de l'analyse de l'absorbance [103].

Développé initialement pour la reconnaissance de composés organiques volatils (COV) [104], ce dispositif a été mis en œuvre pour la détection de COV toxiques [103] mais aussi de divers

arômes de café [105]. Ce système a par la suite été utilisé, toujours en milieu gazeux, pour le suivi de croissances bactériennes et pour l'identification d'espèces et de souches différentes comme *Escherichia coli* ou *Staphylococcus epidermidis* [106].

Pour l'étude des solutions complexes, les colorants sont déposés selon la technique sol-gel formant une membrane nano-poreuse et hydrophobe afin d'éviter leurs décrochages et leurs éliminations lors du contact avec l'échantillon liquide. Ce système est ensuite mis en contact avec le milieu liquide quelques secondes, pour obtenir les variations colorimétriques. Ces résultats sont ensuite analysés de manière statistique afin de pouvoir identifier et distinguer différentes boissons comme la bière [107] ou les sodas (Figure 1-20). Cette eT permet également d'identifier l'absence de sucres et la présence d'édulcorants comme l'aspartame [108].

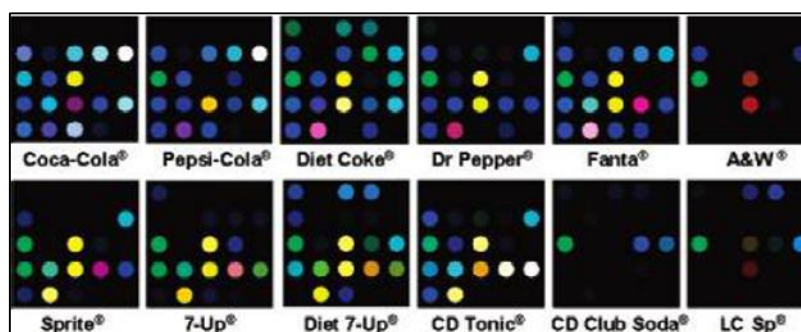


Figure 1-20 : Profils colorimétriques obtenus lors de l'analyse de différentes boissons gazeuses. Les termes « CD » et « LCSP » définissent respectivement les boissons Canada Dry® et LaCroix Sparkling Water®.

Un autre système colorimétrique de langues électroniques a été conçu par l'équipe du professeur Eric Anslyn de l'Université Austin (Texas) pour réaliser l'identification d'analytes moléculaires et ioniques. Pour concevoir leurs récepteurs, un groupement benzène hexasubstitué a été utilisé comme structure de base (« scaffold ») puis associé à des polypeptides, comme l'illustre la Figure 1-21. L'ensemble de ses composants permet ainsi de former une cavité [109]. En modulant la composition de ces bras peptidiques, il est possible de reconnaître diverses cibles par des interactions de type liaisons hydrogènes, ioniques ou hydrophobes [110]. Les acides boriques présents dans la structure du récepteur permettent leur association avec les sucres [111-113].

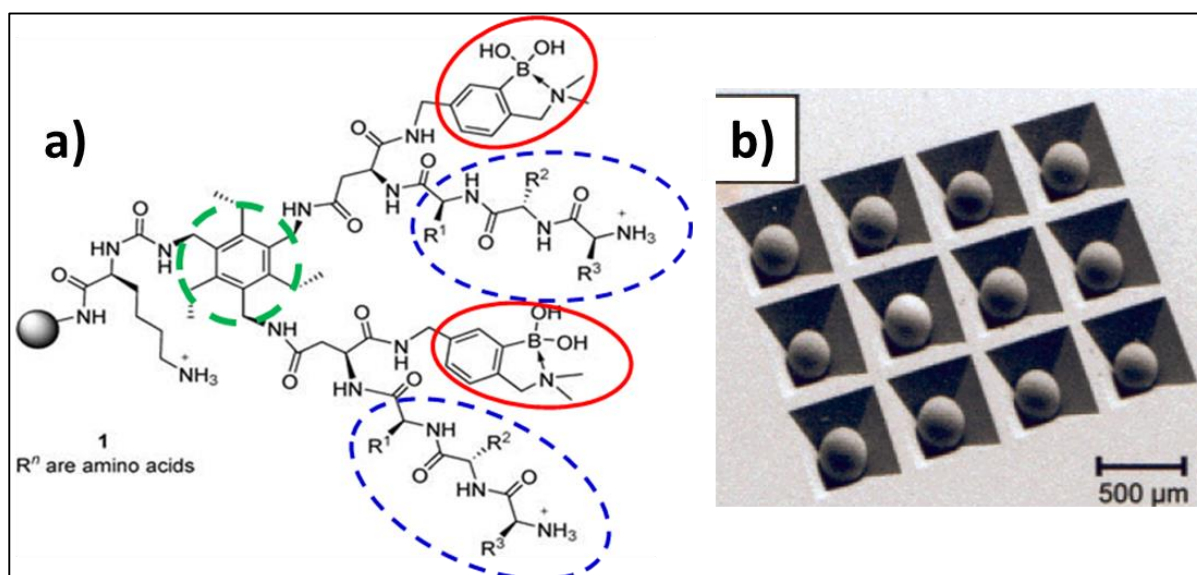


Figure 1-21 : a) Schéma des constituants d'un récepteur synthétique. Le benzène (cercle en vert) est hexa substitué et crée une cavité de liaison. Les bras peptidiques (cercles en pointillé bleu) pourront varier la sélectivité du système pour des protéines en fonction des acides aminés de différentes natures utilisés (notés R). Les acides boriques quant à eux sont cerclés en rouge [110]. b) Image de microscopie électronique à balayage des microcavités de silicium contenant des billes de verre [114].

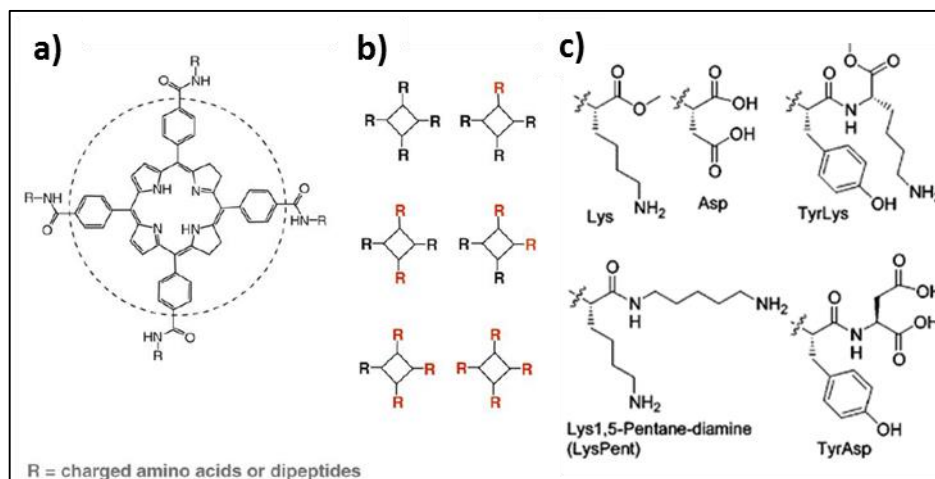
Chacun des récepteurs a été immobilisé de manière covalente sur des billes de polystyrène ou d'agarose en fonction de l'application souhaitée. Ces billes sont ensuite déposées dans des microcavités de silicium percées afin d'améliorer leur temps de contact avec le milieu analysé par analogie avec les papilles de la langue [18, 115]. Les récepteurs sont alors mis en contact avec un colorant qui colore les billes par son association avec les récepteurs. Lorsque l'échantillon est introduit, l'effet de compétition entre celui-ci et le colorant provoque la dissociation et l'élimination du colorant de la surface des billes. La variation d'absorbance mesurée par une caméra CCD permet ainsi de générer un motif de reconnaissance pour chaque échantillon.

Grâce aux différentes structures de récepteurs, diverses molécules sont différenciables comme les nucléosides triphosphates (ATP, GTP), des peptides phosphorylés [110, 116, 117] ou non [118-120] ; les protéines [110, 121], les glycoprotéines [110], les neuropeptides de la famille des tachykinines qui se caractérisent par une séquence C-terminale commune [122] et les différents sucres [17, 123].

1.4.3.2 Fluorescence

Le groupe du professeur Hamilton de l'Université d'Oxford a développé au début des années 2000, des récepteurs dérivés de la porphyrine dans le but d'analyser et de distinguer différentes familles de protéines.

Ces récepteurs se composent tous d'un centre de tétra-phényl-porphyrine (TPP) qui contribue à l'affinité du récepteur auquel sont ajoutés en périphérie des substituants impliqués dans la sélectivité des cibles [124]. La modification périphérique des TPP permet de synthétiser un grand nombre de récepteurs tétra-carboxy-phényl-porphyrine (TCPP) en utilisant des aminoacides ou des peptides de taille, de charge, d'hydrophobicité différentes. Il est également possible de moduler leurs propriétés de reconnaissance en variant la position des substituants comme l'illustre la Figure 1-22. Les divers récepteurs TCPP ainsi obtenus, présentent des réactivités croisées variables qui permettent de répondre de manière distincte aux cibles.



La détection de ce système s'appuie sur les propriétés de fluorescence intrinsèque des TCPP dont l'intensité sera modifiée lors de son association avec les molécules cibles [124]. Dans le cas d'application pour les protéines, la réponse de l'ensemble des récepteurs constitue un motif de reconnaissance (sous forme d'histogrammes), distinct pour chacune des cibles étudiées (Figure 1-23). Ce motif est alors considéré comme « l'empreinte digitale » de la molécule et peut être utilisé pour réaliser son identification. De plus, les auteurs ont démontré la possibilité d'estimer les concentrations des composants qu'ils soient purs ou issus de mélanges.

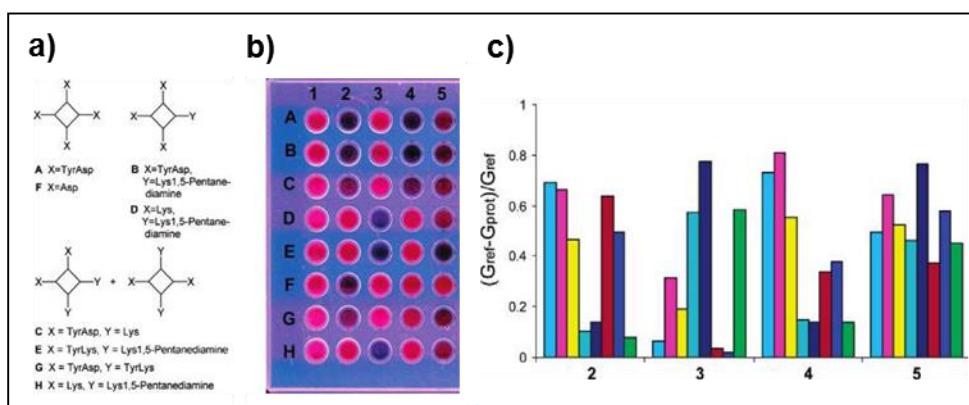


Figure 1-23 : a) Structure schématique des 8 récepteurs porphyriques notés de A à H
 b) Fluorescence obtenue après excitation UV à une longueur d'onde de 302 nm. La colonne 1 représente la fluorescence de référence de chacun des 8 récepteurs. Les colonnes 2 ; 3 ; 4 et 5 représentent respectivement les fluorescences obtenues après l'addition des protéines de cytochrome c ; ferrédoxine ; cytochrome c551 et myoglobine à une concentration comprise entre 500 et 600 μM .
 c) Motifs de reconnaissance obtenus pour chacune des protéines lors de l'utilisation des 8 récepteurs de porphyrines. La hauteur des barres quantifie le changement de fluorescence mesurée [125].

L'approche utilisée par le groupe du professeur Rotello de l'Université du Massachussets, se fonde sur la synthèse d'une bibliothèque de récepteurs basée sur un polymère hautement fluorescent dérivé du poly(para-phénylène-éthynylène) (PPE). Ce type de polymère peut interagir avec la surface des protéines par des interactions multivalentes grâce à leur charge et à leur structure comme le montre la Figure 1-24. En modifiant la taille et la charge des substituants du polymère, il est possible de faire varier leur affinité avec les protéines. La détection de l'interaction moléculaire est réalisée ici par l'enregistrement de la diminution de la fluorescence du PPE issue du phénomène de « quenching » lors de la liaison du polymère avec la protéine. Cette décroissance de signal fluorescent est proportionnelle à la quantité de molécules liées au récepteur utilisé.

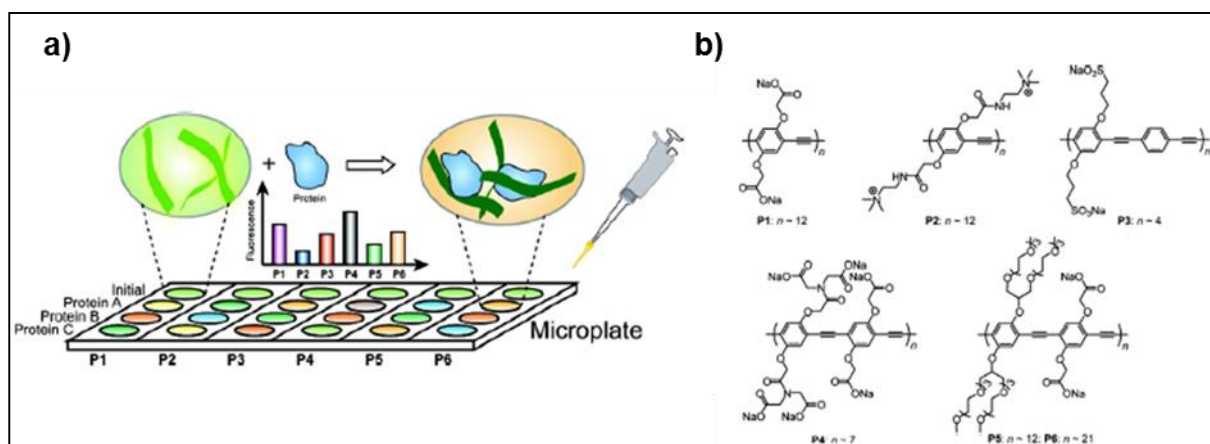


Figure 1-24 : a) Système de langue électronique à base de PPE hautement fluorescent.
 b) Les structures de certains récepteurs sont également présentées [126].

Le système a ensuite été amélioré afin d'augmenter grandement sa sensibilité par l'utilisation de nanoparticules d'or (NPs) comme matériels sensibles. Ces nanoparticules ont été pré-

fonctionnalisées (NPF) avec une monocouche auto-assemblée. Elles se composent donc d'un cœur hydrophobe, d'une couche de PEG biocompatible et stabilisante et d'une surface chargée positivement grâce aux groupements ammoniums périphériques. Il est également possible de moduler la sélectivité des nanoparticules pour les cibles en modifiant la nature des groupements R comme l'illustre la Figure 1-25 [126].

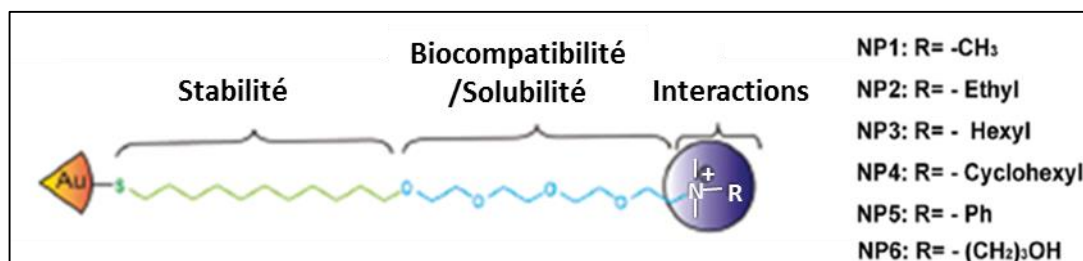


Figure 1-25 : Structures des nanoparticules cationiques fonctionnalisées avec différents ligands R afin d'obtenir diverses nanoparticules notées de NP1 à NP6 et associées au polymère anionique fluorescent PPE [127]

Les NPF sont associées tout d'abord avec un PPE chargé négativement, ce qui entraîne une extinction importante de la fluorescence du polymère (quenching) [128]. Lorsque des cibles telles que les protéines sont introduites dans le milieu d'analyse, l'équilibre du complexe NPF-PPE est modifié. On observe un effet de compétition d'affinité des NPF vis à vis du polymère PPE d'une part et de la protéine présente en solution d'autre part [129, 130]. Lorsque l'affinité est plus importante pour la molécule cible, le polymère PPE est libéré dans le milieu, ce qui augmente l'intensité de fluorescence (Figure 1-26).

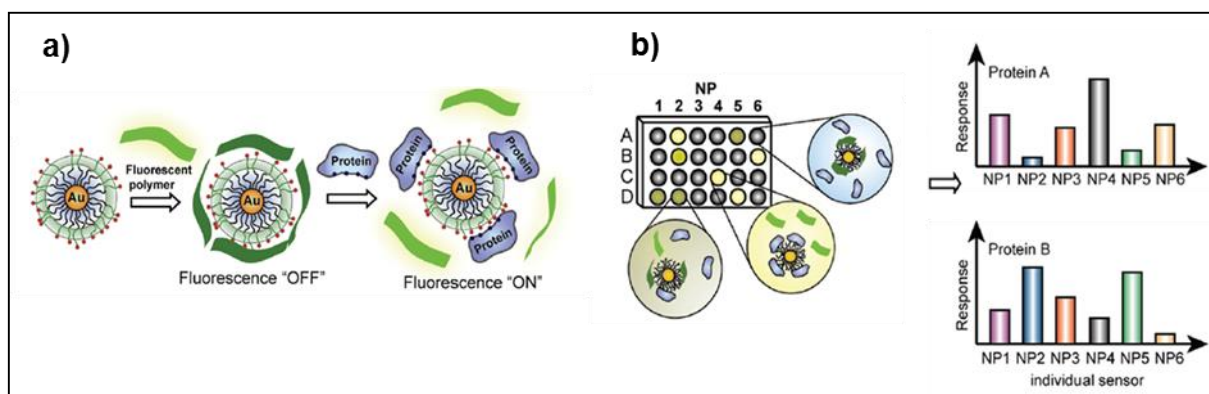


Figure 1-26 : Illustrations schématiques du système de langue électronique basée sur l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées conjuguées à un polymère fluorescent. a) Illustration du phénomène de compétition entre un complexe PPE-NPF et des protéines qui conduit à la restauration de la fluorescence. b) Schéma d'un réseau de récepteurs différentiels générant des motifs de reconnaissance différents pour deux protéines analysées.

Le polymère de PPE a par la suite été remplacé par une protéine fluorescente: la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Cette modification a ainsi contribué au succès de la discrimination des protéines dans le sérum humain à des concentrations physiologiques, donc relativement

faibles. On peut citer notamment l'application potentielle de ce système pour la différenciation des cellules normales, cancéreuses ou métastatiques [131]. Ce système a également été appliqué pour détecter et identifier des bactéries de type Gram positive ou Gram négative [132]. Dans ce cadre d'étude, les nanoparticules ont été fonctionnalisées par des entités chargées positivement tout en veillant à leur conférer un caractère hydrophile ou hydrophobe [132]. Diverses espèces et souches de bactéries comme *P. putida* ou *B. subtilis* et *Escherichia coli* ont pu être discriminées (Figure 1-27) [133, 134].

Remarque : La différenciation des souches a été réalisée dans une simple solution tampon et non dans des milieux complexes [132].

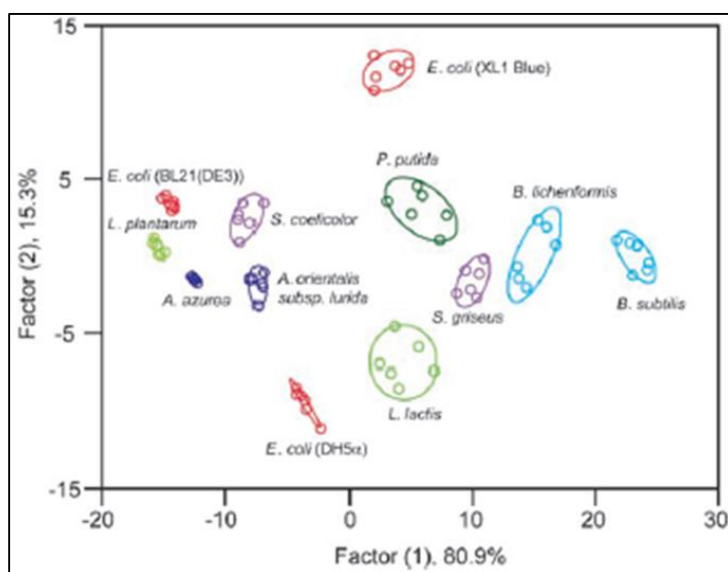


Figure 1-27 : Représentation graphique des motifs de réponse de fluorescence pour des bactéries de différentes espèces après analyse discriminante linéaire. La covariance globale de l'analyse est de 96,3% ADDIN EN.CITE [Erreur ! Signet non défini..

Ces résultats montrent l'étendue des langues électroniques pour des applications dans le secteur médical et alimentaire.

Plus récemment, leur système a encore été amélioré grâce à des NPF qui ont été associées initialement avec une enzyme, la β -Galactosidase, empêchant par conséquent son activité catalytique. L'association des NPF avec des cibles (comme les cellules de mammifères), restaure alors la fonction d'hydrolyse de la β -Galactosidase pour un substrat fluorogène ce qui induit un changement colorimétrique dans le milieu (Figure 1-28). L'utilisation de cette enzyme a permis d'intensifier le signal de reconnaissance et d'améliorer grandement la sensibilité de détection à 1 nM pour des cibles de type protéiques [137]. Cette méthode couple donc l'amplification de signal due à la réaction enzymatique avec la versatilité de récepteurs à

réactivités croisées des langues électroniques. Cette langue électronique reste à ce jour, pour la détection de protéines, le système le plus sensible.

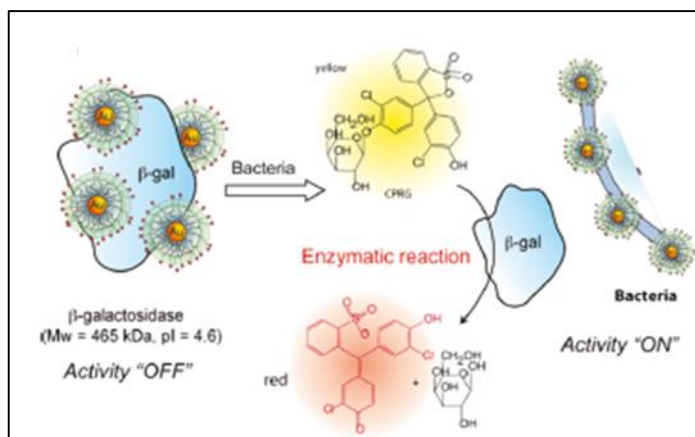


Figure 1-28 : Représentation schématique du système de détection NPF- β -galactosidase (β -Gal). L'association des NPF avec des molécules cibles restaure l'activité catalytique de la β -galactosidase pour le substrat fluorogène 4-méthylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside, ce qui permet d'amplifier le signal de fluorescence associé à la reconnaissance [127].

En résumé ces langues électroniques utilisant des transductions optiques sont très prometteuses cependant elles possèdent des inconvénients. En premier lieu la conception et la synthèse des récepteurs à réactivités croisées qui s'avèrent être complexes ce qui limite leur nombre entre 5 et 20 récepteurs et restreint ainsi leur diversité. De plus le photoblanchiment des molécules fluorescentes peut entraîner une faible durée de vie des molécules ainsi que la faible stabilité du système sur le long terme. En second lieu la plupart de ces systèmes ne peuvent pas être régénérés et réutilisés en raison des fortes associations récepteurs-cibles. Les exemples décrits sont issus de mesures après équilibre qui ne décrivent pas la cinétique de reconnaissance entre les cibles et les matériaux sensibles (suivi en temps réel).

1.4.3.3 Imagerie par résonance plasmon de surface (SPRi)

Le principe de l'imagerie par résonance plasmon de surface (SPRi en anglais) se fonde sur la détection optique de l'intensité lumineuse réfractée. Cette intensité est modulée proportionnellement en fonction des éléments présents en surface du système. Les avantages de ce système sont sa capacité à suivre les associations cibles-sondes en temps réel et sans marquage. Dans le cas d'un dispositif multiplexé, l'ensemble des interactions peut être enregistré simultanément. Dans la littérature, cette méthode est très largement utilisée dans les domaines des biocapteurs et biopuces [138-140] mais notre laboratoire est l'un des premiers à

avoir utilisé ce système pour le développement des nez et langues électroniques [141]. Depuis 2012, une approche combinatoire a été développée afin de simplifier largement l'élaboration des récepteurs à réactivités croisées. Nous avons pour cela utilisé des petites molécules, simples et facilement synthétisables comme briques de bases (BB). Ces BB possèdent des propriétés physicochimiques différentes de type hydrophile, hydrophobe, chargées positivement ou négativement. Leur mélange (combinaison) à des proportions variables et contrôlées, permet de générer rapidement une grande diversité de récepteurs combinatoires à réactivités croisées.

Par exemple à partir de 2 briques de bases mélangées à une concentration totale constante mais variable pour chaque BB de 0 à 100 % avec 10 % d'incrément, il est possible d'obtenir 11 récepteurs combinatoires, comme l'illustre la Figure 1-29. De la même manière l'utilisation de 3 BB génère quant à elle, 66 récepteurs. Il est donc possible de créer rapidement un très grand nombre de matériaux sensibles. Ainsi avec n briques de bases, un incrément de concentrations de i %, le nombre de récepteurs potentiels est défini par la relation $[(100/i) + n - 1] ! / (n - 1) ! (100/i) !$

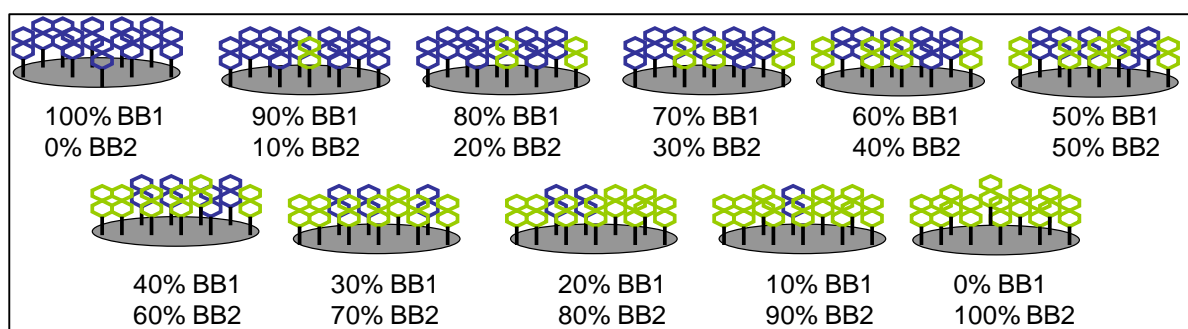


Figure 1-29 : Représentation des surfaces combinatoires avec les 11 mélanges contenant 2 briques de bases à différentes proportions mais dont la concentration totale reste constante.

La preuve de concept de ce système s'est inspirée de la grande famille des glycosaminoglycanes et plus particulièrement des héparanes sulfates qui peuvent interagir de manière spécifique avec certaines protéines telles que les chimiokines et cytokines. Pour cela, nous avons développé un système de langue électronique utilisant deux BB: le lactose et le lactose sulfate dont les mélanges sont déposés sur la surface d'un prisme d'or pour s'auto-assembler afin de constituer les récepteurs à réactivité croisée (surfaces sensibles). Le prisme fonctionnalisé et multiplexé, est ensuite couplé au système de détection SPRi afin de pouvoir analyser des glycoprotéines en temps réel.

Les motifs de reconnaissance générés par ce nouveau système de langue électronique permettent de représenter de manière continue les réponses des récepteurs. En effet leurs conceptions par combinaisons de briques de bases rendent les propriétés des récepteurs différentes mais relativement proches. De plus lors d'analyses d'échantillons, les signaux

généralisés montrent une évolution continue mais non-linéaire, par exemple le récepteur composé de 10% de lactose peut présenter un signal plus important que celui des récepteurs purs. L'utilisation à différentes proportions des briques de bases pour constituer les récepteurs combinatoires est donc très pertinente. Elle permet également de représenter ces résultats soit sous forme d'un profil continu 2D soit sous la forme d'une image continue 3D pour établir la signature des molécules étudiées (Figure 1-30). Ce système breveté a prouvé son potentiel pour la détection et l'identification de protéines de natures différentes [142], mais aussi la possibilité de discriminer des protéines natives et des protéines mutantes [143] à des concentrations de quelques centaines de nanomolaires.

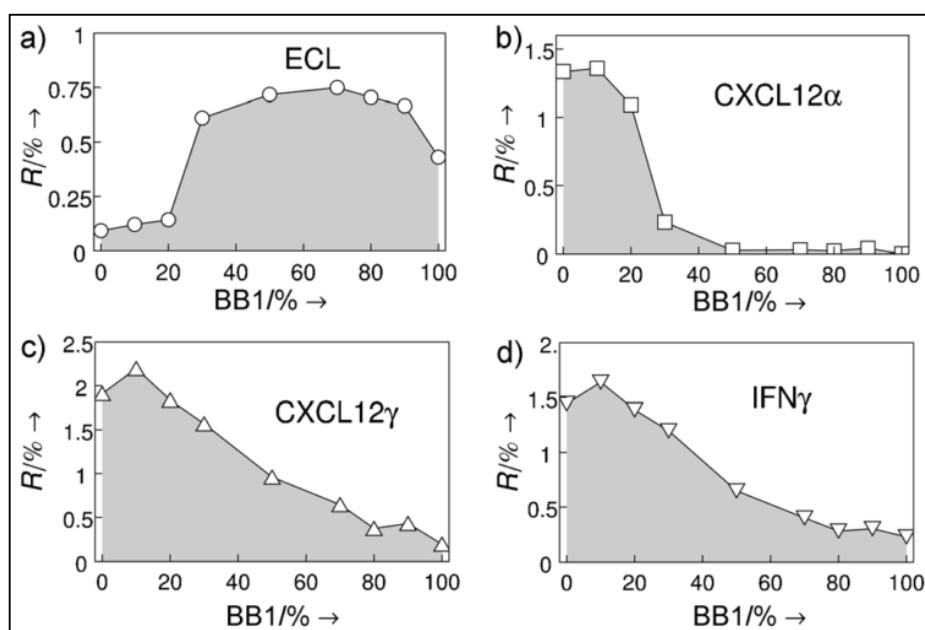


Figure 1-30 : Représentation de réponses obtenues par notre système de langue électronique lors de l'étude de 4 protéines présentant des affinités différentes pour les héparanes sulfates. Les isoformes α et γ des chimiokines CXCL12 ainsi que la cytokine de l'interféron γ (IFN γ) ont été étudiées. La protéine pro-inflammatoire Erythrina cristagalli lectine (ECL) a été également étudiée comme contrôle en raison de l'absence d'affinité particulière pour les héparanes sulfates. BB1 % représente la proportion de lactose constituant le récepteur combinatoire.

Comparée aux systèmes de langues électroniques, les avantages de notre système sont:

- D'une part, l'utilisation de molécules simples et facilement accessibles : les briques de bases, pouvant générer une grande diversité de détection grâce à l'approche des récepteurs combinatoires à réactivité croisée. Ces récepteurs combinatoires permettent d'obtenir des informations nouvelles et supplémentaires et permettent de renforcer la sélectivité du système.
- D'autre part, il est possible à partir des récepteurs combinatoires et l'imagerie SPR, de générer une réponse temporelle et continue comme l'image 3D alors qu'à ce jour, presque tous les systèmes eN/eT existants sont basés sur une réponse à l'équilibre. Nous avons montré lors d'une étude antérieure que la

réponse temporelle améliore la discrimination des échantillons analysés par rapport à la réponse issue de l'équilibre.

- De plus grâce à l'approche combinatoire, les signaux générés par l'interaction récepteur-analyte peuvent être représentés sous formes continues. En conséquence, le signal anormal obtenu avec un récepteur peut être facilement identifié et exclu si nécessaire en cas d'un défaut de fabrication. Cette particularité est unique et avantageuse en comparaison des approches traditionnelles eN/eT comparant un ensemble de données discrètes non corrélées.

- Enfin l'étalonnage et la vérification de l'ensemble des récepteurs du système sont réalisés de manière globale avec une seule et même molécule à l'inverse des eN/eT traditionnels qui nécessitent souvent un étalonnage capteur par capteur.

1.5 Projet de thèse

Mon projet de thèse fait suite aux travaux réalisés dans le laboratoire sur le développement d'une langue électronique simplifiée dans son design ainsi que dans la fabrication du matériel sensible. Initialement ce projet est issu de la collaboration entre le laboratoire Semi-Conducteur Grand Gap (SC2G) de l'Institut Néel et le groupe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques (CREAB) rattaché au laboratoire Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaire (SPrAM UMR 5819, CNRS-CEA-UJF) et du financement du Laboratoire d'excellence LANEF de Grenoble (ANR-10-LABX-51-01).

Les objectifs de ce travail initiaient le développement d'un second système de langues électroniques utilisant un réseau de microélectrodes diamant fonctionnalisées par l'approche combinatoire associé avec un système électrochimique de type voltamétrie. De plus cette nouvelle langue électronique était développée dans le but de discriminer et d'identifier des objets complexes en comparaison avec la méthode de langue électronique utilisée par la méthode de SPRi. Cependant les travaux menés sur le diamant n'ont pas aboutis à l'élaboration d'un système fonctionnel. C'est pourquoi nous avons réorienté ce travail de thèse sur l'application du système de langue électronique SPRi pour l'analyse de milieux complexes comme le vin, la bière et le lait mais aussi d'objets complexes comme les bactéries. Par ces différents milieux ou objets complexes, nous avons comme objectif d'évaluer le potentiel de notre langue électronique pour des applications dans l'agroalimentaire notamment pour les contrôles qualités et la sécurité alimentaire.

Ce manuscrit développera donc dans la suite l'élaboration et le fonctionnement de la langue électronique composée d'un réseau récepteurs combinatoires à réactivités croisées associé à un système de résonance de plasmons de surface. Puis nous détaillerons plus particulièrement les études applicatives réalisées pour la discrimination de milieux complexes ainsi que celles réalisées pour la détection et l'identification de différentes espèces et souches bactériennes. Les travaux préliminaires réalisés sur le diamant au sein du laboratoire SC2G sont présentés dans ce manuscrit en annexe.

Chapitre 2

*Construction de notre
langue électronique*

2 Construction de notre langue électronique

Ce second chapitre décrit dans un premier temps l'imagerie par résonance des plasmons de surface qui est utilisée dans notre système de langue électronique comme élément de transduction. Puis dans un deuxième temps, nous expliquerons la conception des récepteurs combinatoires à réactivités croisées ainsi que la mise en œuvre globale du système issu du couplage du réseau de récepteurs à une partie fluide et à une partie optique (SPRi). Enfin nous détaillerons le traitement de données utilisé pour discriminer d'une part les échantillons en générant des profils 2D et des images 3D et d'autre part pour les classer par l'analyse en composantes principales.

2.1 Un système de transduction : la résonance des plasmons de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique sensible à des variations de l'indice de réfraction près de la surface métallique d'un diélectrique. Dans le cadre de notre étude cette surface représente la partie sensible de notre capteur de type langue électronique. Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter de marquage préalable des molécules à tester et de pouvoir réaliser un suivi en temps réel des interactions entre des sondes immobilisées à la surface du capteur et des analytes. Il est ainsi possible de caractériser les interactions mises en jeu au cours de l'analyse, par l'évaluation de paramètres cinétiques comme les constantes d'association/dissociation ou par la détermination de la concentration en analytes.

2.1.1 Phénomène de résonance plasmon de surface

2.1.1.1. Généralités

Découvert en 1902 par Richard Wood, la résonance plasmon de surface se produit à l'interface entre un métal riche en électrons libre (Au, Ag, ...) et un diélectrique. Ce phénomène est issu du couplage entre une onde évanescente et les plasmons de surface du métal, correspondant à l'oscillation collective des électrons libres. Le système fut mis en œuvre expérimentalement à partir de 1968, selon deux configurations en référence aux travaux de recherche d'Otto (Otto

1968) ou à ceux de Kretschmann et Reather [144]. Mais c'est à partir de 1983 que les chercheurs Nylander et Liedberg exploitent ce phénomène selon la configuration de Kretschmann, dans des appareils de mesures pour réaliser la détection des gaz et de biomolécules par SPR [145].

Pour décrire ce phénomène de résonance plasmon de surface, considérons un système composé de deux milieux d'indice de réfraction (n_1 et n_2) avec $n_2 < n_1$. Lorsqu'une source lumineuse incidente illumine l'interface entre deux milieux tels que du verre (milieu 1) et un milieu liquide ou gazeux (milieu 2), le faisceau se décompose en une partie réfractée et une partie réfléchie comme l'illustre la Figure 2-1. Au-delà d'un certain angle d'incidence dit angle critique (θ_c), défini par la relation de Snell-Descartes $n_1 \sin \theta_c = n_2$, l'ensemble de la lumière se propageant dans le milieu n_1 est réfléchi sur le milieu n_2 . Ce phénomène appelé réflexion totale interne, génère alors une perturbation électromagnétique et la formation d'une onde plane dite onde évanescente confinée à l'interface des deux milieux et dont l'amplitude décroît de manière exponentielle à mesure que la distance avec l'interface augmente [146].

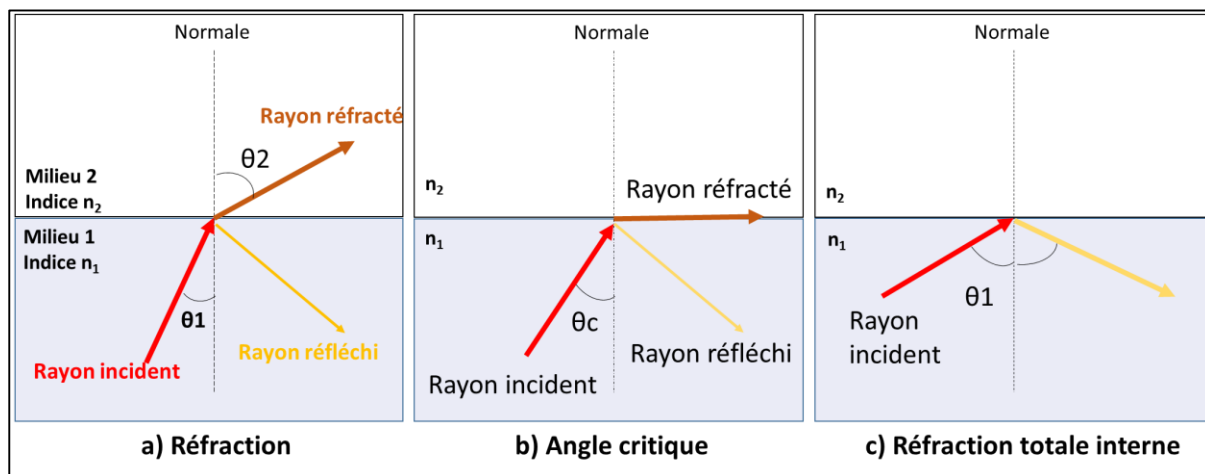


Figure 2-1 : Schéma décrivant la relation de Snell-Descartes ainsi que les rayons réfracté et réfléchi a) Réfraction d'un rayon lumineux pour $\theta_1 < \theta_c$, le rayon incident est aussi partiellement réfléchi dans le premier milieu; b) rayon critique lorsque $\theta_1 = \theta_c$; et c) réflexion totale interne pour $\theta_1 > \theta_c$.

2.1.1.2. Un système optique particulier

Dans un système optique décrit selon la configuration de Kretschmann, une fine couche de métal riche en électrons libres (Au, Ag) est introduite à l'interphase entre le verre d'un prisme à haut indice de réfraction de 1,5 et le milieu à analyser (liquide ou gazeux). La lumière visible, qui traverse le prisme, est totalement réfléchi sur le métal de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur, lorsque l'angle incidence est supérieur à l'angle critique. Dans ces conditions de

réflexion totale, un transfert d'énergie entre la source incidente et la couche métallique se produit, créant des ondes électromagnétiques dite ondes de plasmon de surface. Le terme « plasmon » est lié au phénomène d'oscillation collective des électrons libres du métal à l'interface métal-diélectrique. A un certain angle d'incidence supérieur à Θ_c , appelé angle de résonance Θ_R , les deux ondes résonnent, le couplage de l'onde plasmon et l'onde évanescente est alors maximal, c'est le phénomène de résonance des plasmons de surface.

L'intensité du faisceau réfléchi mesurée par un détecteur, est atténuée lors de ce couplage jusqu'à une valeur minimale correspondant au couplage optimal entre ces deux ondes. L'angle auquel se produit la résonance des plasmons de surface, est caractéristique de l'interface surface métallique - milieu. Il est caractérisé sur la courbe plasmon, représentant la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence, par le minimum d'intensité mesuré comme le montre la Figure 2-2.

Toute variation de composition du milieu adjacent à la surface du métal modifie alors l'indice local, entraînant une modification du couplage. Cette variation est alors traduite par l'augmentation de l'intensité mesurée ainsi que par un changement de valeur de l'angle de résonance [140, 147]. Pour une source monochromatique donnée, le décalage de l'angle de résonance associé à la modification de l'indice local de l'interface métal-milieu, peut être suivi selon deux méthodes comme l'illustre la Figure 2-2. La première notée 1, évalue la modification du milieu en faisant varier de nouveau l'angle d'incidence, Θ_i , pour déterminer le nouvel angle de résonance Θ_{r2} et établir ainsi la différence entre l'angle de résonance considéré comme référence Θ_{r1} et celui nouvellement déterminé Θ_{r2} . La seconde méthode notée 2 sur la Figure 2-2 et utilisée dans la majorité des cas, se base sur la mesure de réflectivité, c'est-à-dire de la variation d'intensité du faisceau réfléchi par rapport au faisceau incident, pour un angle d'incidence de mesure donné (θ_{rim}). Cette méthode évalue la variation de réflectivité avant et après la modification de l'interface comme le décrit la Figure 2-2.

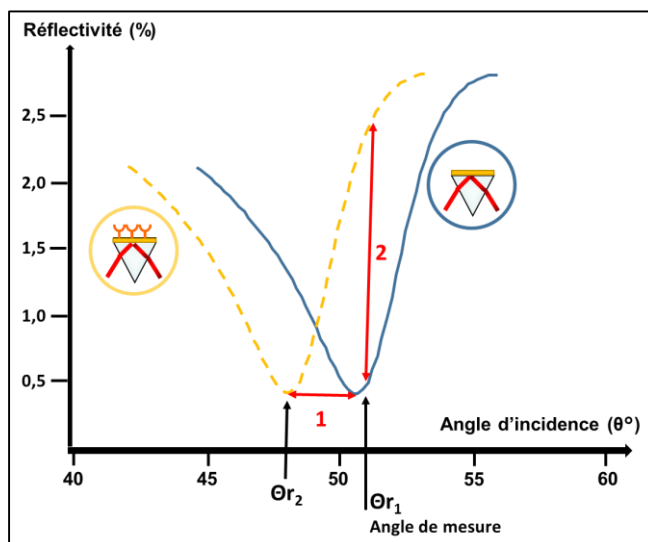


Figure 2-2 : Représentation d'une courbe plasmon. Les liaisons entre les ligands immobilisés sur la surface d'or et les analytes génèrent un changement de position de l'angle de résonance passant de Θ_{r1} à Θ_{r2} pour les mesures à angle variables, avec un décalage vers la gauche noté 1, ou une augmentation de la réflectivité notée 2 pour les mesures réalisées angle fixe Θ_{r1} . Cette modification de position d'angle de résonance ou d'augmentation de réflectivité peut être suivie en temps réel.

Le phénomène optique mis en jeu par le système de détection SPR offre la possibilité de sonder le milieu diélectrique à proximité de l'interface métal-diélectrique puisque toute modification de l'indice du milieu se traduit par des modifications de la courbe plasmon. Cette propriété a notamment été mise à profit pour étudier les interactions de biomolécules sur l'interface couche métallique-diélectrique en temps réel et sans marquage. Il est important de noter que les variations de l'angle de résonance sont proportionnelles à la quantité de matière (cibles) fixée sur la surface fonctionnalisée (sondes) comme le montre la Figure 2-2.

En résumé, la résonance de plasmon de surface est un phénomène optique confiné à l'interface entre un métal et un diélectrique et résulte du couplage de l'onde évanescente et des plasmons de surface de la couche métallique. L'obtention de la résonance de plasmon de surface est dépendante de paramètres comme :

- La longueur d'onde de la lumière incidente
- La polarisation du faisceau lumineux en transverse magnétique (TM) (décrit plus précisément dans « Le système d'imagerie par résonance des plasmons de surface »).
- L'angle d'incidence
- L'épaisseur homogène de la couche métallique afin de permettre le couplage des ondes
- Les indices de réfractifs du système (indice du diélectrique, du verre et du métal)
- La permittivité aux ondes des matériaux comme le verre, l'or, le milieu à analyser

Ces deux derniers points dépendants de la température, nécessitent que l'ensemble du système soit placé dans une enceinte close thermo-régulée.

2.1.2 Le système d'imagerie par résonance des plasmons de surface

L'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi en anglais) est une évolution du système de SPR décrit précédemment pour la détection optique de l'intensité lumineuse réfléchi. Le système SPRi se compose, tout comme le SPR, d'une lumière monochromatique, d'un polariseur pour la lumière incidente en mode transverse magnétique (TM) ou transverse électrique (TE) et d'un capteur pour détecter le faisceau réfléchi, comme l'illustre la Figure 2-3. Cependant dans le système de SPRi, le détecteur optique possède la particularité d'enregistrer des images de la surface grâce à une caméra CCD (Charge Coupled Device). Cette capacité d'imagerie, où chaque zone de la surface étudiée correspond à un pixel du détecteur, permet le suivi de quelques dizaines à plusieurs centaines d'interactions en parallèle et de manière distincte (multiplexage). Il est donc possible de déposer, par zone, des sondes différentes, pour créer un réseau de fonctionnalisation sur une surface, et d'acquérir précisément le signal de chaque zone fonctionnalisée de manière simultanée. Ces variations de réflectivité traduisent quantitativement les interactions entre biomolécules analytes/molécules sondes, c'est-à-dire la quantité de matière (cibles) fixée sur la surface de reconnaissance (sondes).

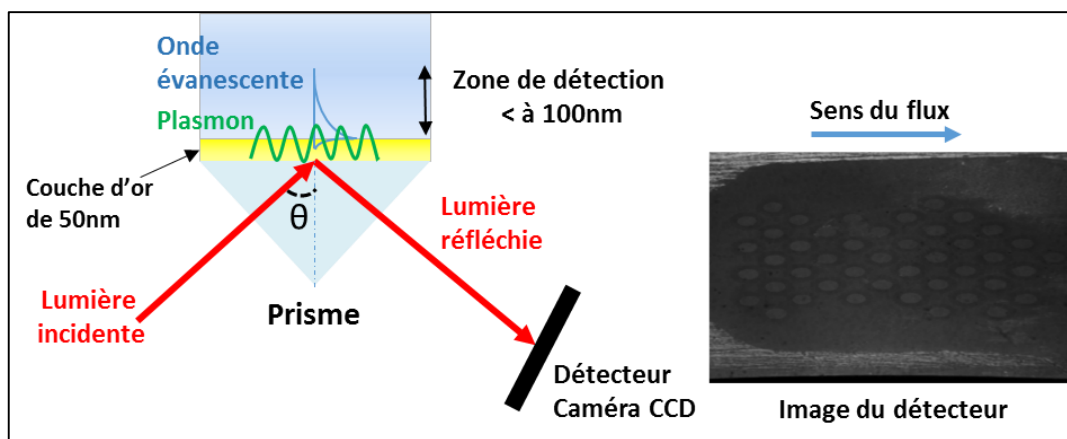


Figure 2-3 : Schéma d'un système d'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi), lorsque l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique et qu'il génère un plasmon sondant la surface sur environ 100nm. Photographie de l'image caméra d'un prisme d'or fonctionnalisé par 44 récepteurs.

2.1.3 Paramétrage du système

En règle générale, le système de détection SPRi se base sur une configuration selon Kretschmann. Le paramétrage du système de détection nécessite la détermination de l'angle de résonance avec le tampon utilisé au cours de l'expérience (blanc de mesure) ainsi que l'angle de mesure dit angle de travail du système. Cet angle, supérieur à l'angle de résonance, est choisi sur la partie linéaire de la courbe plasmon afin de conserver la linéarité du signal sur le plus grand intervalle. Une mesure du signal de référence du détecteur est ensuite prise à cet angle de travail par la polarisation en transverse électrique de la source lumineuse (qui ne génère pas de plasmons de surface). Cette image dite de référence améliore le contraste des images acquises par la caméra CCD en niveau de gris et permet ainsi de mieux établir les variations d'intensité entre le faisceau incident et celui réfléchi en éliminant le bruit de fond du détecteur. Les zones fonctionnalisées sont quant à elles définies par l'opérateur lors du paramétrage du système SPRi afin que les variations de réflectivité puissent être collectées simultanément mais de manière distincte par le détecteur. Les images enregistrées peuvent alors être traduites par le logiciel soit en images différentielles (différence d'intensité mesurée entre une image de référence, sélectionnée par l'utilisateur, et la nouvelle image acquise) ; soit en courbe cinétique, appelée sensogramme, représentant les variations de réflectivité (R%) en fonction du temps.

A titre d'exemple, une source monochromatique polarisée en TM illumine la totalité d'un capteur, dont différentes sondes ont été immobilisées sur la surface d'or pour former un réseau de plots. Lors du passage d'analytes sur la surface de celui-ci, les indices de réfraction à l'interphase métal/milieu d'étude sont localement modifiés tout comme les intensités lumineuses réfléchies associées à chaque zone lors de mesures réalisées à angle fixe, comme le montre la Figure 2-4a. La variation d'intensité mesurée ($\Delta R\%$) est alors reportée sur le sensogramme, qui permet de caractériser les liaisons de manière quantitative par la réflectivité mais également de manière qualitative par la cinétique d'association-dissociation.

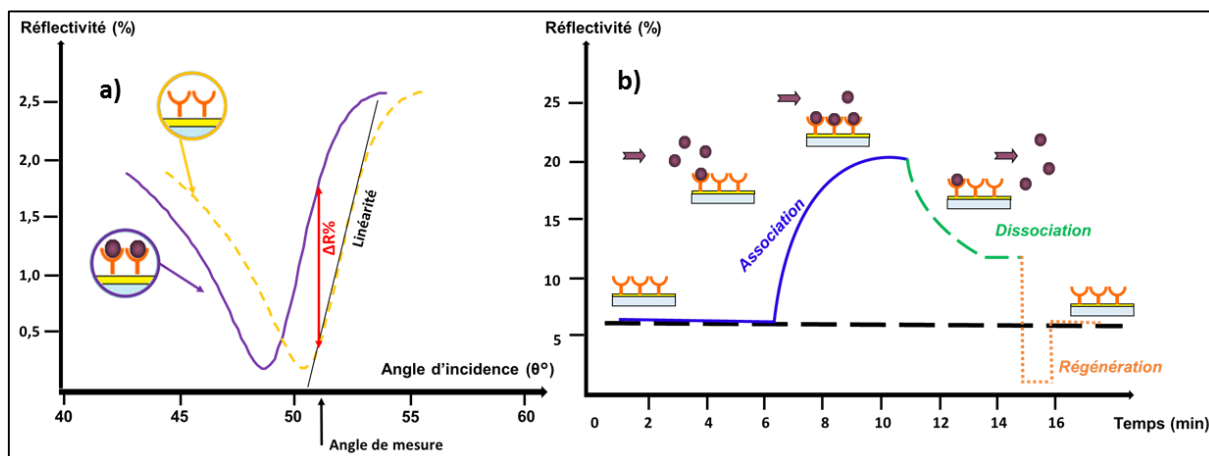


Figure 2-4 : a) Représentation d'une courbe plasmon pour un prisme d'or nu et de la translation de cette courbe pour une surface fonctionnalisée puis liée à des molécules cibles. b) Schéma d'un sensogramme décrivant les variations de réflectivité lors de l'interaction entre une sonde greffée et une cible initialement en solution. Il est possible de décrire l'analyse par : la mise en contact avec la solution tampon pour définir la ligne de base ; l'injection de l'échantillon (phase d'association) suivi de l'étape de rinçage avec l'injection de la solution tampon (phase de dissociation) puis de l'étape de régénération de la surface.

Le sensogramme obtenu par le système SPRi décrit tout d'abord une ligne de base correspondant au signal établi par la solution tampon utilisée. Lorsque la cible diluée dans le tampon est analysée (injectée), une augmentation du signal de réflectivité est observée par l'association cibles/sondes, de manière plus ou moins rapide en fonction de leur affinité. Le système atteint ensuite un équilibre, il y a alors autant d'accrochages que de décrochages cible-sonde sur la surface du capteur. A l'étape de lavage ou rinçage, seul le tampon est de nouveau injecté. Le complexe cible/sonde se dissocie alors progressivement, c'est la phase de dissociation. Cette étape entraîne une diminution du signal jusqu'à un plateau dont la valeur est déterminée par les forces d'interactions entre les cibles et les sondes comme le montre la Figure 2-4b. Cependant lors de l'étape de rinçage, le signal de réflectivité peut ne pas diminuer et conserver la même intensité que celle mesurée lors de la phase d'association, ce qui traduit de fortes affinités cibles/sondes. A l'inverse, le signal de réflectivité SPRi peut revenir lors de l'étape de lavage à un niveau identique de celui de la ligne de base (avant injection). Le système est pour finir régénéré afin de décrocher totalement des cibles fixées, revenir au signal de base correspondant uniquement au tampon et pouvoir réutiliser notre système [148].

2.2 Système SPRi utilisé pour la construction de langue électronique

Notre système de langue électronique se compose pour sa partie capteur multiparamétrique d'un prisme d'or fonctionnalisé par diverses sondes couplé à un dispositif SPRi qui assure la fonction de transducteur par la détection des variations d'intensité. L'ensemble est associé à une partie fluïdique pour introduire les solutions dans la chambre de réaction et mettre en contact les sondes avec les cibles à analyser comme l'illustre la Figure 2-5. L'ensemble du système de détection SPRi ainsi que le capteur multiparamétrique fonctionnalisé sont placés dans une étuve thermo-régulée à 25°C (Memmert IPP 200-400®) afin de limiter l'influence de variation de température sur le phénomène de résonance des plasmons de surface.

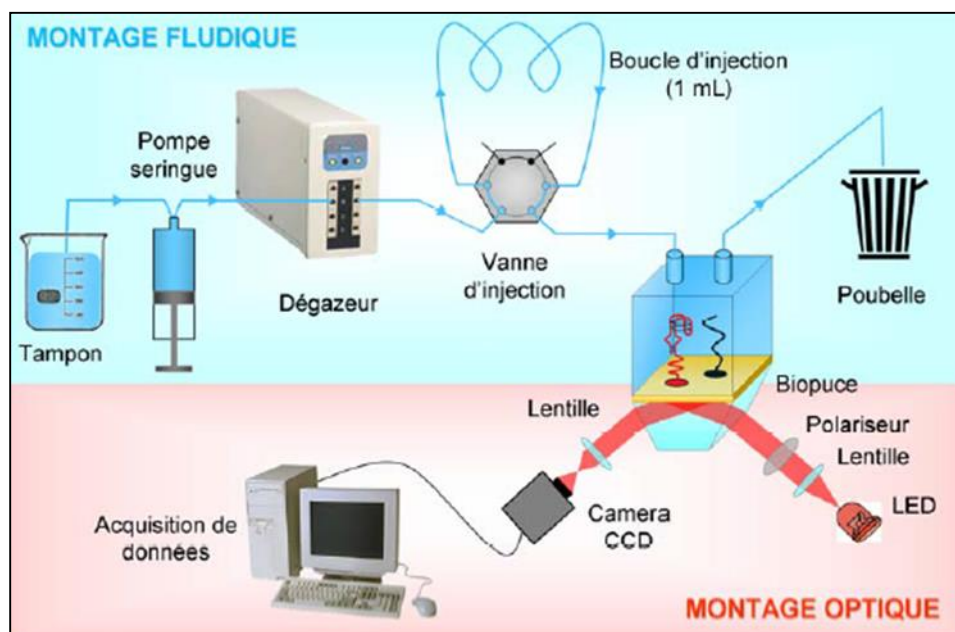


Figure 2-5: Schéma global du système de langue électronique composé d'une partie optique et d'une partie fluïdique [149].

2.2.1 Montage optique de SPRi

Le système de détection SPRi est fourni par Horiba (Horiba Scientific-GenOptics, France) afin d'évaluer les interactions de biomolécules à la surface du capteur en temps réel par suivi des variations de réflectivité. Le montage se compose, comme l'illustre la Figure 2-6.

- d'une source de lumière de type LED générant un faisceau de lumière monochromatique ($\lambda = 635 \text{ nm}$)

- d'un polariseur pour polariser la source lumineuse en TM ou TE
- d'un miroir pivotant pour faire varier l'angle d'incidence du faisceau sur le prisme
- de lentilles pour orienter et dimensionner le faisceau
- d'un détecteur de type caméra CCD (8bits) collectant la lumière réfléchie et enregistrant les images de la surface toutes les 0,2 secondes.

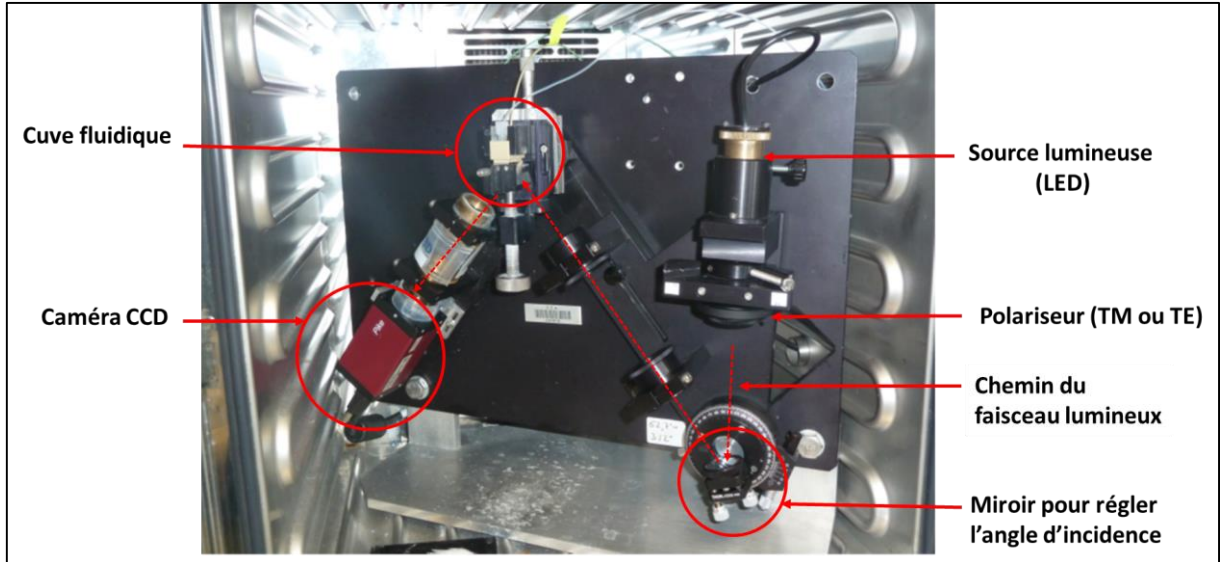


Figure 2-6 : Photographie du système d'imagerie SPRi utilisé.

Le logiciel Horiba Scientific-GenOptics est utilisé pour traiter et convertir en sensogrammes, les variations de réflectivité enregistrées selon les zones définies et sélectionnées du système.

2.2.2 Montage fluidique

Le montage microfluidique se compose de plusieurs éléments :

- Une réserve de solution tampon de même composition et d'un volume suffisant pour permettre son utilisation durant l'ensemble de l'expérience. Ce tampon est réalisé au sein du laboratoire avec une solution aqueuse d'HEPES à pH 7,4 (HEPES 10mM, NaCl 150mM, Tween20@ 0.005% v/v),
- Une pompe Cavro de type pompe seringue de 5mL (Tecan, USA) pour obtenir un flux continu par contrôle informatique (Cavro XLP Cavro 6000, les instruments scientifiques Cavro, États-Unis). Le débit volumique sera lors des expériences compris entre 0,56 μ L/s et 1.56 μ L/s.
- Un système de dégazage (Elite Degassing System™, Alltech, France) où passe le tampon afin d'éviter la formation de bulles d'air, qui perturberait le signal enregistré par modification de l'indice de réfraction du milieu. En effet, si une bulle était

introduite dans la chambre de réaction durant l'injection d'un échantillon, le signal important induit par l'indice de l'air, proche de 1, masquerait celui généré par l'association de l'analyte avec la surface.

- Une valve d'injection 6 ports (Upchurch Scientific, USA) permettant d'avoir une voie fluide principale reliant la sortie du dégazeur à la cuve fluide et une voie annexe (auxiliaire) composée de la boucle d'injection isolée du dispositif. Ces deux voies sont séparées lors du chargement de la boucle mais associées lors de l'injection de l'échantillon. Deux boucles d'injections ont été utilisées avec un volume de 500 μL et de 1 mL.
- Une cellule fluide ou chambre de réaction de forme hexagonale, dont les dimensions caractéristiques sont présentées dans la Figure 2-7. Placée au-dessus de notre capteur, elle permet de recouvrir totalement la surface du prisme par la solution étudiée. Il est important que la solution soit homogène au sein de la cuve et qu'elle puisse être éliminée de la surface du capteur. Au cours de l'étude nous avons utilisé des cuves de 10 μL , 31 μL et 52 μL .
- Divers fils de connectique situés entre la boucle d'injection et la cellule fluide correspondent à un volume mort, déterminé expérimentalement à 300 μL .

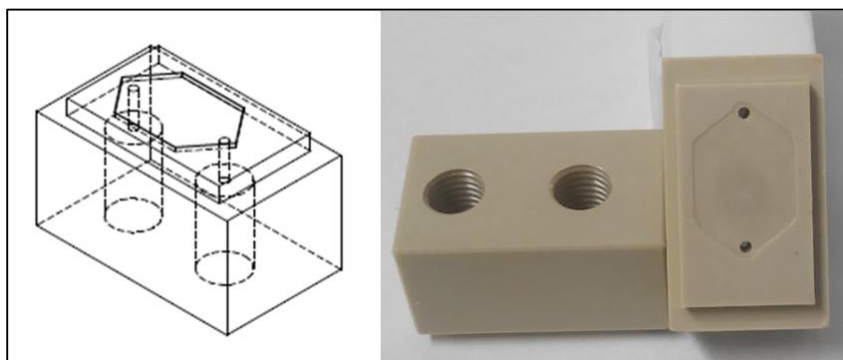


Figure 2-7 : Image SolidWorks de la vue du dessous de la cellule fluide dont le volume de 52 μL est contenu dans la forme hexagonale. L'entrée et la sortie nécessaires pour les écoulements sont les cylindres, les plus importants permettent de connecter les tubes fluidiques. Photographie de la cuve du dessus à gauche et du dessous à droite.

Remarque : L'ensemble du circuit fluide est composé du matériau PEEK afin de limiter l'adsorption des molécules biologiques sur la surface.

2.3 Réalisation du réseau de récepteurs combinatoires

Dans le cadre de l'étude, le choix d'une détection d'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi), impose de concevoir l'ensemble de notre capteur sur un prisme de verre recouvert d'une fine couche métallique, fourni par la société Horiba Scientific-GenOptics (Orsay, France). L'or a été choisi comme couche métallique riche en électrons, c'est un élément chimique inerte dont la non-toxicité le rend compatible pour l'étude de milieux biologiques. L'épaisseur homogène de 50 nm a été déterminée afin de correspondre aux conditions optimales de résonance des plasmons de surface. En effet, il a été établi que pour une longueur d'onde comprise entre 600 et 1000nm, il est nécessaire d'avoir des épaisseurs d'or comprises entre 44nm et 50nm pour obtenir une meilleure résonance des plasmons de surface [150]. L'onde évanescente créée, pénètre alors dans le film métallique jusqu'au milieu biologique sur une profondeur d'environ 100nm [151]. La fonctionnalisation du prisme doré est réalisée par auto-assemblage en monocouche (SAM « Self Assembled Monolayer ») des récepteurs via la chimie thiols grâce à la forte affinité entre l'or et le soufre [152].

2.3.1 Prétraitement du prisme

Avant l'utilisation de prisme, la surface d'or a été nettoyée dans un réacteur à plasma, le Femto 300 (Diener Electronic, Allemagne). Cette étape se déroule 3 minutes sous une puissance de 40 volts et à une pression de 0,6mBar composée à 75% d'oxygène et à 25% d'argon. L'oxygène présent en majorité dans le milieu entraîne une décomposition en gaz des molécules contaminant le support. Le bombardement d'atomes d'argon rompt quant à lui, les liaisons chimiques des oxydes éventuellement présents à la surface du support d'or pour créer des sites actifs de type radicalaire. Ce nettoyage rendant la surface d'or très hydrophile, il est alors impossible de réaliser immédiatement le dépôt des sondes sous forme de micro-gouttelettes puisque celles-ci s'étalent sur la surface et coalescent. Après optimisation, l'étape de fonctionnalisation est donc réalisée 48 heures après ce prétraitement afin d'obtenir une procédure reproductible pour la fonctionnalisation de surface en accord avec les études réalisées sur les SAMs [153]. Durant ce laps de temps, le prisme est conservé dans une atmosphère close contenant un gaz d'argon.

2.3.2 Description des molécules sondes utilisées

Dans cette étude, nous avons utilisé 2 disaccharides comme briques de base, le lactose et le lactose sulfaté pour inscrire ce travail dans la continuité des travaux réalisés précédemment sur

les protéines et de pouvoir comparer si besoin les résultats obtenus. Afin de pouvoir greffer ces deux sucres sur le prisme doré, ces derniers ont été modifiés en ajoutant un espaceur ainsi qu'un groupement terminal thiol. L'ensemble de ces modifications réalisées par l'équipe de Professeur David Bonnaffé de l'Université de Paris-Sud, nous permet d'obtenir les 2 briques de base hydrophiles : le lactose neutre, noté BB1 et le lactose sulfate chargé négativement noté BB2 dont les structures sont présentées ci-dessous dans la Figure 2-8.

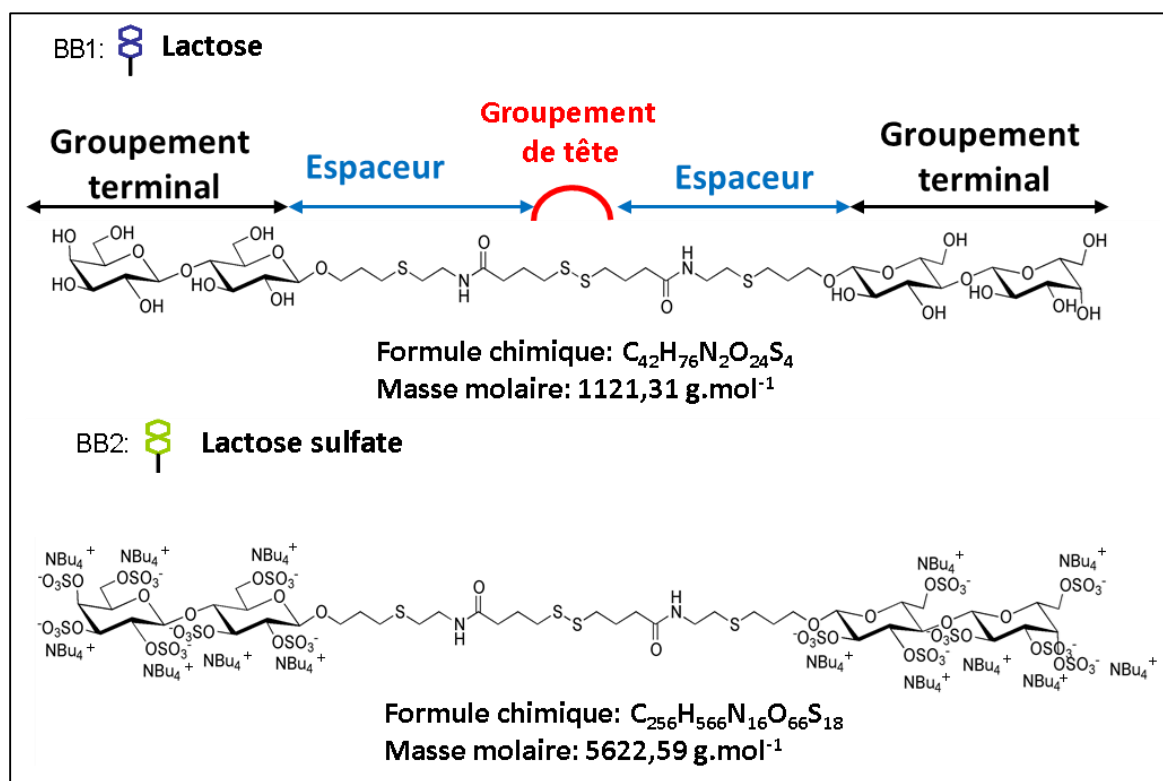


Figure 2-8 : Schéma des structures chimiques des sucres utilisés. Ces molécules symétriques se composent du groupement terminal dit sensible pour effectuer la reconnaissance des molécules, d'un espaceur et d'un groupement de tête de disulfure qui forme de manière spontanée une couche SAMs lors de l'étape de fonctionnalisation de la surface d'or.

2.3.3 Préparation et réalisation des récepteurs combinatoires à réactivité croisée

Dans l'étude, les deux briques de bases (BBs) ont été utilisées pour réaliser 11 mélanges à différents ratios afin d'obtenir après dépôt sur la surface dorée du prisme, 11 récepteurs combinatoires (RC) aux propriétés physicochimiques différentes. La concentration totale en disaccharides dans chacune des solutions est constante et égale à 0,1mM tandis que le rapport de concentration des briques de bases est variable selon l'équation suivante :

$$\frac{[\text{Lactose}]}{[\text{Lactose}] + [\text{Lactose-sulfate}]}$$

Équation 1

Les 11 solutions sont préparées selon le Tableau 2-1, et définies en fonction de leur pourcentage en lactose contenu, il y a ainsi les récepteurs composés de 0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 et 100% de lactose. Les concentrations mises en jeu en lactose étant différentes pour chaque récepteur ; les propriétés de surface associées, c'est-à-dire les propriétés d'affinité et de sélectivité pour des cibles seront variables, c'est ce qui définit un récepteur différentiel. L'ensemble des solutions est préparé dans une solution tampon HEPES à pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20® 0.005% v/v) et dans de l'eau ultra-pure ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) avec 10% de glycérol afin éviter l'évaporation des solutions déposées sous forme de microgouttelettes à la surface du prisme lors de la fonctionnalisation de surface.

Tableau 2-1 : Table décrivant les solutions et leurs proportions afin de réaliser les récepteurs combinatoires. La concentration finale en sucre de chaque solution est de 0,1mM.

	100% BB1	90% BB1	80% BB1	70% BB1	60% BB1	50% BB1	40% BB1	30% BB1	20% BB1	10% BB1	0% BB1
BB1 0,2mM dans HEPES (en μL)	25	22,5	20	17,5	15	12,5	10	7,5	5	2,5	0
BB2 0,2mM dans HEPES (en μL)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
H ₂ O+10% glycérol (en μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Ensuite, chaque composition est préparée, puis déposée sans contact, sous forme de gouttelettes de 8 nL, soit par robot spotter piézo-électrique Siliflow (France), soit par le robot-spotter SciFlexarrayer™ S3 de Scienion AG (Allemagne) illustré dans la Figure 2-9 a) et b). Les solutions sont déposées quatre fois sur la surface du prisme (quadriplacat) avec un volume total de 8 nL pour chaque dépôt ou spot. L'ordonnancement de ces plots est assimilable à une matrice bidimensionnelle Figure 2-9 c) et d). La disposition des plots sur la surface dorée du prisme répond à un ordre préétabli afin d'éviter leurs juxtapositions, de pouvoir comparer les signaux obtenus par des prismes différents et de déterminer, par exemple, l'existence d'effets de bords par la cuve.

Remarque : La matrice de dépôt est également représentée dans l'Annexe 4.

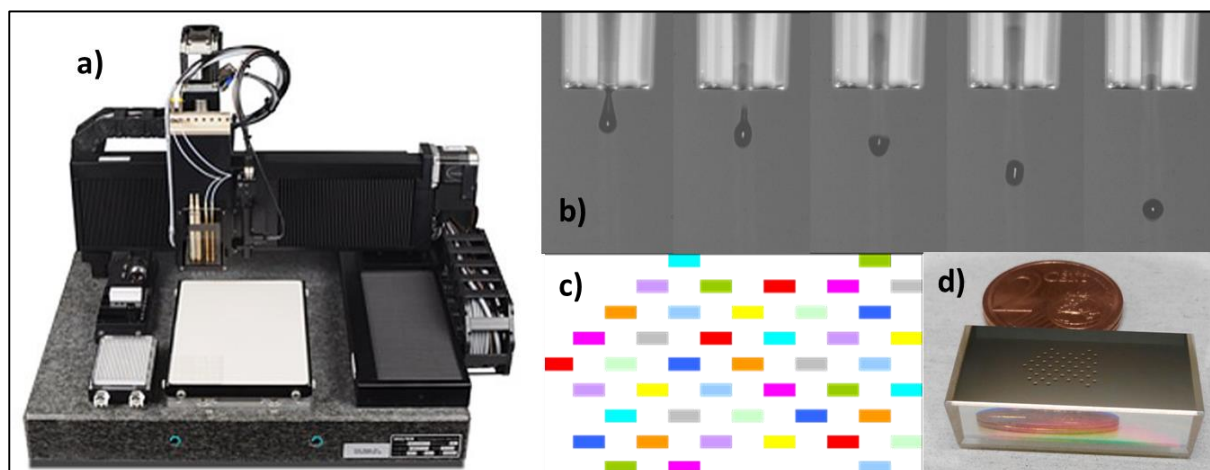


Figure 2-9 : a) Photographie du robot-spotter SciFlexarrayer™ S3 de Scienion AG. b) Photographies des gouttelettes éjectées par le système piézo-électrique du robot spotter SciFlexarrayer™ S3. c) Image de la matrice bidimensionnelle de dépôt. Chaque couleur correspond ici à un récepteur combinatoire différent. d) Photographie du prisme doré après des dépôts des solutions pour constituer les récepteurs à réactivités croisés.

La construction proprement dite des récepteurs combinatoires différentiels, est réalisée lors de l'auto-assemblage moléculaire des mélanges de lactose/lactose sulfaté en une monocouche (SAM), comme le montre la Figure 2-10. Cet ancrage non covalent sur la surface dorée résulte de l'affinité importante entre l'or et les groupements thiols des briques de bases modifiées [154-156]. Afin d'obtenir une monocouche dense et bien ordonnée, en d'autres termes des plots homogènes, le temps de contact minimum entre la surface d'or et « les 8 nL des solutions de mélanges de BBs » est de 18h [157]. Il est supposé ici que le rapport de chaque brique de base auto-assemblée à la surface du prisme correspond au rapport molaire de la solution déposée [158].

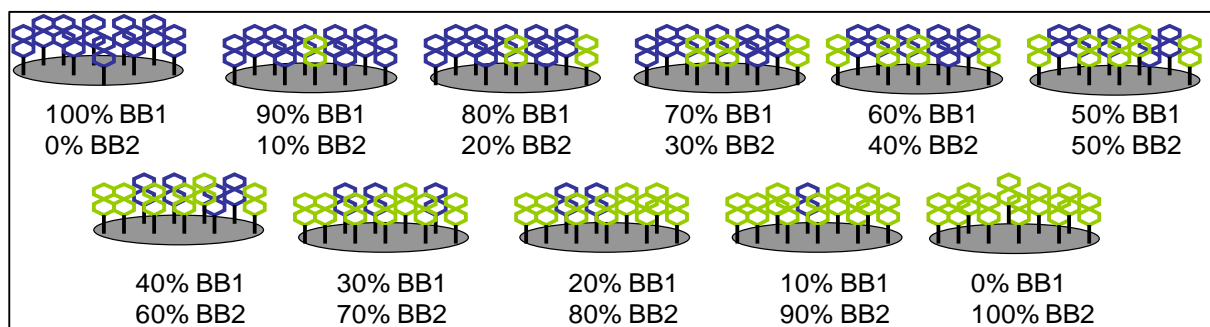


Figure 2-10 : Représentation schématique des 11 récepteurs combinatoires à réactivités croisées constitués de 2 briques de bases à différentes proportions.

Le prisme est ensuite déposé dans une boîte de Pétri contenant 1mL d'eau pure durant les 18h nécessaires pour la fonctionnalisation afin d'obtenir une atmosphère humide et éviter ainsi le dessèchement des gouttes [157]. Enfin l'ensemble du prisme est soigneusement rincé avec une grande quantité d'eau dé-ionisée pour éliminer les molécules sondes en excès non ancrées, puis

séché sous un flux d'argon et conservé au réfrigérateur à 4°C. L'approche de fonctionnalisation ainsi que les briques de bases utilisées permettent d'obtenir des récepteurs combinatoires à réactivité croisée dont la préparation et la réalisation sont simples et peu coûteuses. De plus le système développé est réutilisable après régénération de la surface par l'ajout d'un détergent ; le sodium dodécyl sulfate (SDS) concentré à 2% m/v. Cette solution permet de décrocher totalement des cibles fixées à la surface du prisme sans dégrader les surfaces sensibles [148].

2.4 Traitement des données

Les données de réflectivité sont acquises par le système toutes les 10^{ème} de seconde et sont converties par le logiciel en images différentielles ainsi qu'en sensogrammes pour l'utilisateur en se basant sur les valeurs numériques de réflectivité obtenues au cours de l'expérience. Ces informations sont ensuite analysées pour établir un profil continu 2D ainsi qu'une image 3D pour chaque échantillon, présentés ci-dessous dans la Figure 2-11.

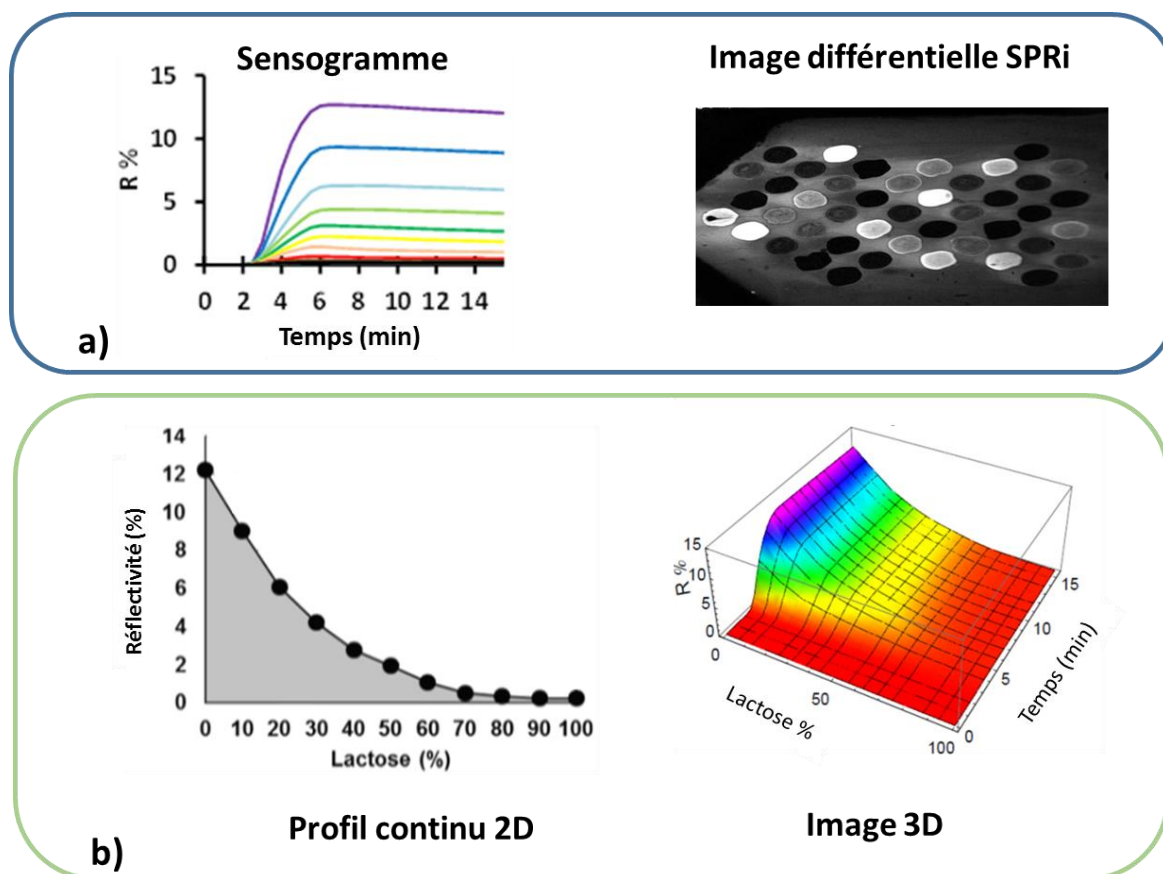


Figure 2-11 : a) Traitement des données obtenus par le logiciel SPRi : image différentielle du SPRi en niveau de gris, plus l'intensité est blanche plus il y a de quantité de matière déposée sur les récepteurs combinatoires, donc plus la réflectivité mesurée est importante. Cette image traduit les informations du sensogramme à un temps précis. b) A partir des données du sensogramme, des profils 2D et des images continues 3D peuvent être générés afin de valoriser la composition des récepteurs combinatoires à réactivité croisée.

2.4.1 Méthode de discrimination

2.4.1.1. Sensogrammes

Comme nous l'avons dit précédemment dans la partie 2.1.2 de ce chapitre, le sensogramme décrit l'évolution de la réflectivité en fonction du temps, de chaque récepteur combinatoire de notre langue électronique, pour une molécule ou solution cible. Diverses informations quantitative et qualitative peuvent être extraites à partir de l'amplitude du signal et de la cinétique d'interaction (association-dissociation-équilibre) afin de discriminer les échantillons entre eux. Le sensogramme permet ici d'évaluer la réactivité croisée de nos récepteurs qui est commune au système de nez et langues électroniques. Toutefois cette seule représentation ne permet pas de valoriser la réalisation de récepteurs combinatoires, si particulière dans notre système de langue électronique. C'est pourquoi des profils continu 2D ainsi que des images 3D sont générés.

2.4.1.2. Profil continu 2D

Le profil continu 2D ou profil de reconnaissance décrit la réflectivité mesurée à un temps donné, en fonction de la proportion en BB1 (lactose) constituant le récepteur combinatoire. Le temps étudié est sélectionné lors de la phase de rinçage, lorsque le signal obtenu reflète l'affinité de liaison cible-récepteur. Lors de la phase d'injection, l'introduction du milieu contenant les molécules d'intérêt modifie l'indice de réfraction du système. Ce profil de reconnaissance permet également de mieux évaluer l'affinité de liaison par rapport aux autres récepteurs combinatoires.

En règle générale, les approches de traitements de données pour les systèmes de nez et langues électroniques classiques se basent sur des données discrètes non corrélées, puisque les récepteurs sont totalement différents les uns des autres. Dans le cas de notre langue électronique, la surface des récepteurs combinatoires se composent des deux mêmes constituants dont les proportions sont modifiées afin d'obtenir des récepteurs différentiels, les profils peuvent donc être présentés sous formes de courbes continues. Grâce à la continuité du signal généré par le traitement de données, il est possible d'identifier plus facilement les signaux aberrants résultant d'un dysfonctionnement lors de la fabrication des récepteurs combinatoires à réactivité croisée, ou d'une dégradation par usure naturelle du système lors de son utilisation.

2.4.1.3. *Image 3D*

La seconde représentation des résultats est l'image 3D, qui définit la variation de réflectivité en fonction du temps et de la proportion en BB1 composant chaque récepteur combinatoire. Elle correspond au sensogramme auquel un axe de proportion en lactose de chaque récepteur a été ajouté. Cette représentation, en trois dimensions, reflète les affinités de liaisons tout comme le profil continue 2D, mais aussi les forces d'interactions établies entre les cibles en solution et les sondes fixées sur le prisme doré. L'image 3D combine donc les informations cinétiques du sensogramme aux affinités de liaisons établies par le profil de reconnaissance.

Ces deux représentations continues générées à partir des données du sensogramme peuvent être utilisées comme les signatures des molécules ou des solutions analysées en d'autres termes comme leurs « empreintes digitales ». Elles permettent ainsi en fonction de l'étude, de cibler l'analyse des résultats sur l'affinité entre récepteurs combinatoires ; sur leurs cinétiques ou parfois les deux afin de se compléter comme nous pourrons le voir par la suite. De plus les profils et les images permettent d'identifier les récepteurs combinatoires défectueux de notre système de langue électronique.

2.4.2 Méthode de classification

Afin de classifier les différents échantillons étudiés aux cours de ces travaux, nous avons utilisé la méthode d'Analyse en Composantes Principales (PCA).

Cette méthode statistique exploratoire permet à partir de données quantitatives recueillies et définies par plusieurs variables (n dimensions), de les représenter de manière plus pertinente par un nombre réduit de variables ; les composantes principales. Ce nombre de composantes réduit généralement au nombre de 2 ou 3 permet une représentation simplifiée des données par des graphiques 2D ou 3D. Dans le cadre de notre étude, les réflectivités mesurées pour chaque échantillon représentent nos données quantitatives et sont définies ici par la composition en lactose des récepteurs combinatoires ainsi que par le temps. L'ensemble des données va être examiné afin d'explorer les ressemblances entre les échantillons ainsi que les liaisons entre les variables. Les données sont alors organisées et orientées selon des axes correspondant aux composantes principales pour étendre le nuage de données en déformant le moins possible la réalité et établir ainsi leur dispersion ou variance en pourcentage.

Plus le pourcentage de variance pour l'axe est élevé, meilleure est la discrimination des échantillons sur cet axe, c'est-à-dire à partir de cette composante principale (PC en anglais pour « Principal Component »). Pour obtenir cette représentation PCA, une réorganisation des

données est effectuée un changement de repère selon l'axe présentant la meilleure discrimination (pourcentage de variance le plus élevé) PC1 puis selon un deuxième axe, PC2, présentant la seconde meilleure variance de manière à ce que PC1 soit orthogonale à PC2 comme le décrit la Figure 2-12.

Par analogie avec la photographie, la PCA recherche le meilleur angle de vue pour transcrire en photographie (2D) ce que nous observons dans notre environnement (3D)[159].

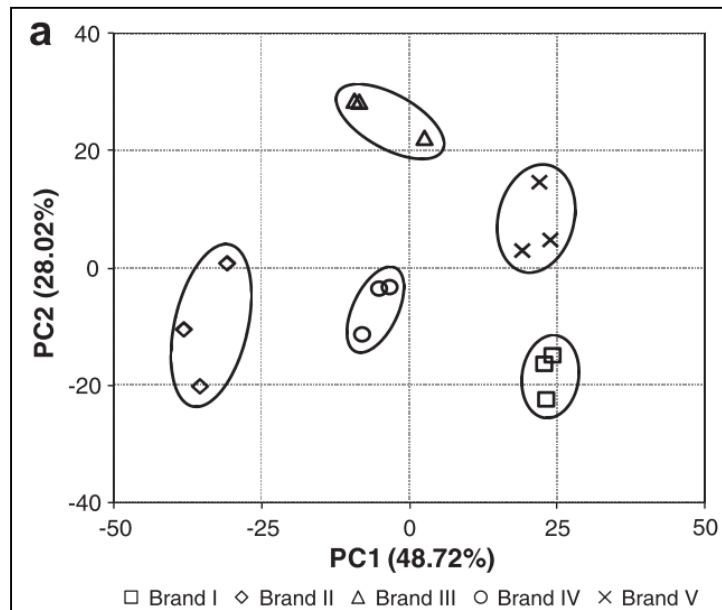


Figure 2-12 : Représentation d'une PCA pour résumer de manière pertinente les données avec une perte d'information proche de 23%, la somme globale des variances étant d'environ 77%. Elle permet de résumer visuellement les données et de mettre en évidence les 5 groupes ou clusters en anglais étudiés dans ce travail [160].

Dans le cadre de notre étude de classification des échantillons, le traitement global des données a été réalisé grâce au Logiciel Mathematica 10.0. Cette analyse statistique des résultats infirme ou confirme les observations décrites à partir des profils et des images d'évolution continue puisque les informations extraites du traitement de données sont représentées de manière non supervisée.

Chapitre 3

*Analyse des mélanges
complexes par notre
système de langue
électronique*

3 Analyse des mélanges complexes par le système de langue électronique

Nous avons vu dans le premier chapitre que le système de langue électronique basé sur des récepteurs combinatoires à réactivités croisées, est très pertinent pour la discrimination des protéines pures. L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de notre dispositif pour analyser des milieux complexes contenant des centaines de molécules tels que les boissons (vin, bière, lait, *etc.*).

L'enjeu principal de cette étude est de vérifier si les récepteurs combinatoires composés seulement de deux briques de bases sont capables de répondre différemment aux milieux complexes avec une bonne sélectivité. Toutefois des incertitudes demeurent quant à la saturation des récepteurs combinatoires lors de la mise en contact avec ces échantillons complexes en raison d'un éventuel manque de réactivité croisée.

3.1 Analyse des mélanges complexes vin/bière/lait

Pour cela nous avons testé en premier lieu trois types de mélanges complexes : le vin, la bière et le lait. L'ensemble des échantillons est ouvert juste avant d'être analysé pour subir des prétraitements lorsque cela est nécessaire. Les bières sont dégazées sous vide au travers d'un verre fritté de 22 μm puis filtrées à nouveau dans un filtre seringue de 0,2 μm pour être ensuite diluées dans du tampon HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20®, pH 7,4) à 10% v/v. Les vins quant à eux sont filtrés à deux reprises au travers d'un filtre seringue de 0,2 μm puis dilués dans le tampon d'HEPES à 1% v/v. Les mélanges complexes de vin et de bière ont été dilués à des concentrations différentes afin d'obtenir des intensités de signal comparables. Pour le lait, l'ensemble des échantillons provient de la même bouteille de lait et est dilué à 0,125% v/v avec du tampon HEPES. L'analyse à un débit constant de 1,56 $\mu\text{L.s}^{-1}$ est ici découpée en deux phases: une première de 7 minutes qui correspond à l'introduction des milieux complexes dans la cuve fluidique, c'est la phase dite d'injection. Puis une seconde phase de 7 minutes dite de rinçage qui correspond au passage du tampon HEPES dans la cuve fluidique. Le volume total d'échantillon introduit dans la cuve fluidique est ici de 330 μL .

Dans un premier temps, nous avons observé la sensibilité mais surtout la bonne sélectivité des récepteurs combinatoires à réactivités croisées pour chaque type de mélanges complexes afin de les discriminer. Dans un second temps nous avons diversifié l'origine des échantillons.

L'étude a ainsi porté sur trois vins français d'appellation d'origine contrôlée (AOC) générique : le Côtes du Rhône ; Bordeaux et Bourgogne ainsi que sur trois bières : la Stella Artois (Belgique) ; la Leffe (Belgique) et la Pelforth brune (France) ainsi que du lait demi-écrémé stérilisé à Ultra Haute Température (UHT).

3.1.1 Différentiation des 3 mélanges complexes

L'injection des trois types de mélanges complexes a permis d'obtenir des sensogrammes différents et de révéler ainsi la sélectivité de la langue électronique pour les solutions analysées. Comme l'illustre la Figure 3-1, l'analyse des réponses a généré des profils continus 2D à un temps donné et des images 3D décrivant l'évolution de la réflectivité au cours du temps.

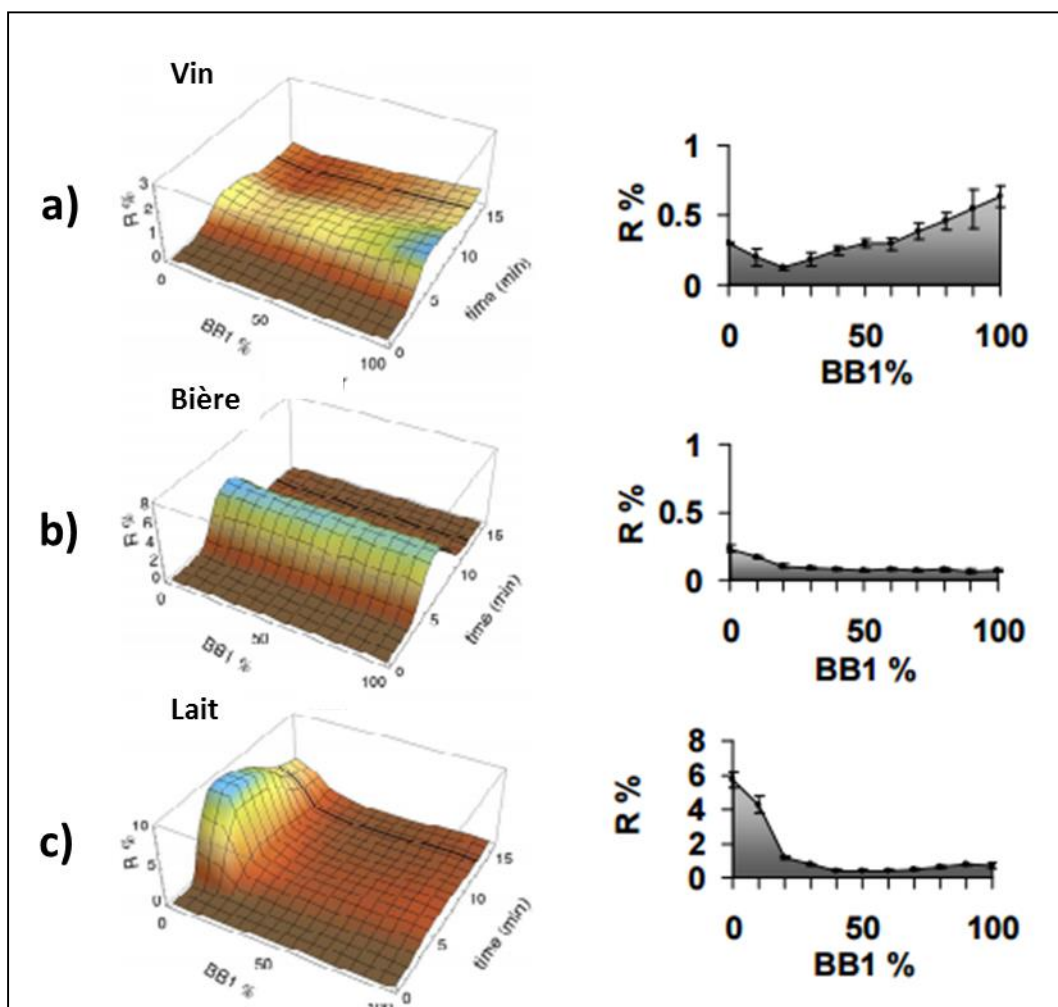


Figure 3-1 : Exemple de représentation des images 3D (à gauche) et des profils continus 2D (à droite) obtenus à la 13^{ème} minute pour a) le vin rouge de Bourgogne, b) la bière Leffe et c) le lait UHT. Le profil continu 2D est établi à partir de la moyenne des 4 répliques de récepteurs combinatoires présents sur un même prisme, les barres d'erreurs observées représentent donc les écarts types.

Les images 3D du vin de Bourgogne, de la bière Leffe et du lait permettent d'illustrer la cinétique observée et d'obtenir des informations sur l'association et la dissociation de chacun des échantillons. Lors de la phase d'injection une augmentation importante de la réflectivité est mesurée pour atteindre vers 5 minutes, un signal maximum à environ 1 et 5% respectivement pour le vin, la bière et à 9% pour le lait. Puis la réflectivité diminue progressivement de manière plus ou moins rapide pour se stabiliser lors de la phase de rinçage. La comparaison des profils 2D est établie à la 13^{ème} minute, c'est-à-dire à la fin de la phase de rinçage lorsque le signal de réflectivité décrit uniquement l'affinité de liaison cible-récepteur (sans saut d'indice de réfraction). La Figure 3-1, montre que le vin rouge présente une forte affinité pour les récepteurs composés uniquement de lactose (100% BB1). La bière et le lait présentent au contraire une meilleure affinité pour les récepteurs composés à 100% de lactose-sulfate (0% BB1). Malgré une dilution plus importante du lait à 0,125% v/v, l'intensité des signaux mesurés à la 13^{ème} minute indique une plus forte affinité pour les récepteurs combinatoires avec un signal maximal à 6% contre 0,25% pour la bière et 0,6% pour le vin. L'affinité de liaison est donc plus importante entre l'échantillon de lait et les récepteurs.

Les profils continus 2D et les images 3D issus de l'analyse des sensogrammes mettent en évidence les différences entre les échantillons en termes d'affinités et d'intensité de signal. Les trois types de mélanges complexes peuvent ainsi être identifiés et différenciés entre eux, en utilisant le profil continu 2D et l'image de reconnaissance 3D comme des « empreintes digitales ».

3.1.2 Classification des 3 mélanges complexes

Afin d'explorer la capacité de notre système de langue électronique à classer les mélanges complexes, de nouveaux échantillons ont été introduits dans l'étude. Les six échantillons de vin, de bière ont été injectés à trois reprises de manière aléatoire sur notre langue électronique tout comme ceux de laits injectés après différents temps d'incubation. Nous avons ainsi réalisé l'analyse des 33 sensogrammes obtenus pour extraire les profils 2D associés 13 minutes après le début de l'injection (c'est-à-dire en fin de rinçage), ainsi que l'image continue 3D de chaque échantillon. Une représentation de l'ensemble des résultats, présentée Figure 3-2, a ensuite été établie par la méthode statistique d'analyse en composantes principales des images 3D. L'acquisition des données toutes les 30 secondes durant 14 min sur chacun des 11 récepteurs (28 mesures d'intensité) définissent 308 paramètres parmi lesquels deux d'entre eux permettent de représenter l'ensemble de résultats de manière simplifiée avec un maximum d'informations (variance globale).

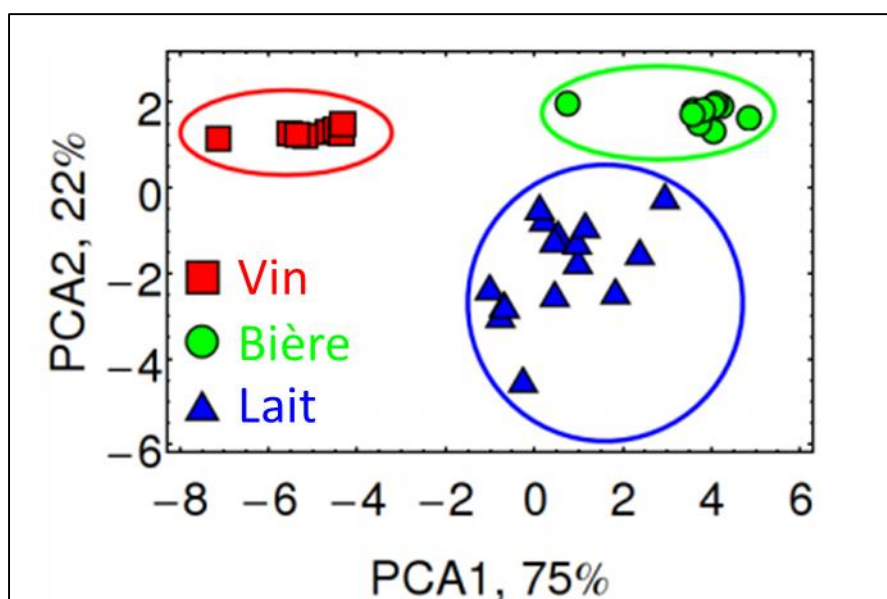


Figure 3-2 : Représentation de l'analyse en composantes principales pour classer les mélanges complexes de vins, de bière et de lait selon deux composantes principales.

La Figure 3-2 montre que l'ensemble des échantillons se distingue selon leur type à savoir le vin, la bière et le lait, avec une variance globale de 97% (c'est-à-dire avec une perte d'information de 3%). Le système développé est donc adapté à la discrimination et à la classification de ces trois types de mélange complexe, chacun d'entre eux se regroupant dans une zone bien délimitée du graphique et propre à chaque échantillon. En revanche la distinction d'origine des échantillons de vin (Côtes du Rhône, Bordeaux et Bourgogne) ainsi que les marques de bière (Stella Artois, Leffe et Pelforth) est ici impossible puisque les résultats sont regroupés dans une zone restreinte. Il semble ici nécessaire d'introduire de nouvelles briques de bases, aux propriétés physicochimiques différentes, pour discriminer de manière plus efficace les différentes origines ou marques des échantillons d'alcool.

Les divers échantillons de lait, quant à eux, se regroupent dans une zone mais présentent une importante dispersion ce qui laisse à penser qu'un suivi du vieillissement peut être réalisé avec notre dispositif. Cette observation, nous a incités à réaliser une étude plus importante sur le lait pour des échantillons d'origine animale ou végétale ainsi que sur son vieillissement au cours du temps.

3.2 Analyse de différents types de laits

Pour réaliser cette étude, 5 boissons ont été utilisées ; du lait de vache cru et du lait de vache stérilisé à ultra haute température (UHT), une boisson au soja, une boisson au soja aromatisée au chocolat et une boisson au riz. Le terme de boisson est utilisé pour les liquides d'origines végétales, en référence à la réglementation en vigueur, où le terme de lait n'est appliqué que pour les liquides d'origine animale. En effet le 1^{er} article du Décret du 25 mars 1924 indique que « *la dénomination "lait" sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désignée par la dénomination "lait" suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient : "lait de chèvre", "lait de brebis", "lait d'ânesse", etc....* » [161].

Avant leur commercialisation l'ensemble de ces mélanges a subi un traitement, le plus souvent thermique, utilisant différentes combinaisons de temps et de température, afin de minimiser la contamination microbienne des produits tout en conservant leurs qualités organoleptiques. Ainsi pour les boissons végétales seule la technique de stérilisation à 115-120°C durant 20 à 30 minutes est utilisée, contrairement au lait dont le traitement thermique peut être réalisé selon 4 méthodes. C'est pourquoi la spécification du traitement thermique mis en œuvre est utilisée pour décrire les laits employés.

Le système de langue électronique est utilisé en premier lieu pour distinguer des échantillons de natures différentes, comme le lait de vache et les boissons végétales de soja et de riz, puis pour discriminer des mélanges de même nature, ayant subi un traitement thermique différent. L'analyse portera dans un premier temps sur les sensogrammes obtenus par les différentes boissons, puis sur les profils continus 2D et les images 3D générés pour ensuite présenter globalement les résultats par l'analyse en composantes principales.

3.2.1 Caractéristiques des boissons analysées

Obtenues à partir d'eau et de graines, les boissons végétales ne contiennent pas de lactose et ne sont pas normalisées dans l'industrie. Les fabricants peuvent ainsi enrichir leurs produits avec des vitamines (B12 et B3), du calcium, ou encore du fer en fonction de leur propre cahier des charges. Ces boissons présentent donc des compositions différentes par rapport au lait d'origine animale mais aussi entre industriels comme le montre le tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Comparatifs des contenus nutritionnels pour 100 mL de produits entre une marque de distributeur et celle d'un leader du marché biologique. Les nutriments marqués d'un astérisque sont des mentions obligatoires sur les emballages.

	Boisson de soja-chocolat	Boisson de soja	Boisson de riz	Lait de vache
Valeur énergie* kJ	310	178	231	450
Matières grasses* (g)	2,5	2,5	1	3,5
- Acide Gras saturés	0,5	0,4	0,1	
- AG mono insaturés	0,5	0,7	0,3	
- AG poly insaturés	1	1,4	0,6	
Glucides* (g)	8,5	1	11	5
Sucres* (g)	8	1	5	5
Fibres alimentaires (g)	1,1	0,1		
Protéines* (g)	3,8	4	0,2	3,5
Sel* (g)	0,1	<0,04	0,1	

3.2.2 Discrimination des boissons

Les sensogrammes générés lors de l'injection des boissons végétales et des laits d'animaux décrivent une cinétique différente et présentent une sensibilité variable pour les récepteurs combinatoires (Figure 3-3).

La phase d'injection montre une augmentation de la réflectivité au cours du temps pour l'ensemble des mélanges mais la phase de rinçage décrit deux cinétiques. La première présente une dissociation supérieure à 25% du mélange avec les récepteurs, entre le signal maximal de la phase d'injection et le signal stabilisé de la phase de rinçage. Un nouvel équilibre est donc atteint lors de la phase de rinçage à une valeur de réflectivité inférieure au maximum. Mais ce groupe peut encore être divisé en fonction de la vitesse de stabilisation du signal. En effet la boisson de riz présente un signal stabilisé à la 11^{ème} minute tandis que le lait de vache est tout juste stabilisé 14 minutes après le début de l'injection. La seconde cinétique décrite lors de la phase de rinçage présente une très faible variation du pourcentage de réflectivité entre la fin de la phase d'injection et la fin de la phase de rinçage, comme c'est le cas pour les deux boissons de soja. Il existe donc une forte affinité entre les récepteurs combinatoires et les échantillons de soja, le signal étant stabilisé presque à sa valeur maximale.

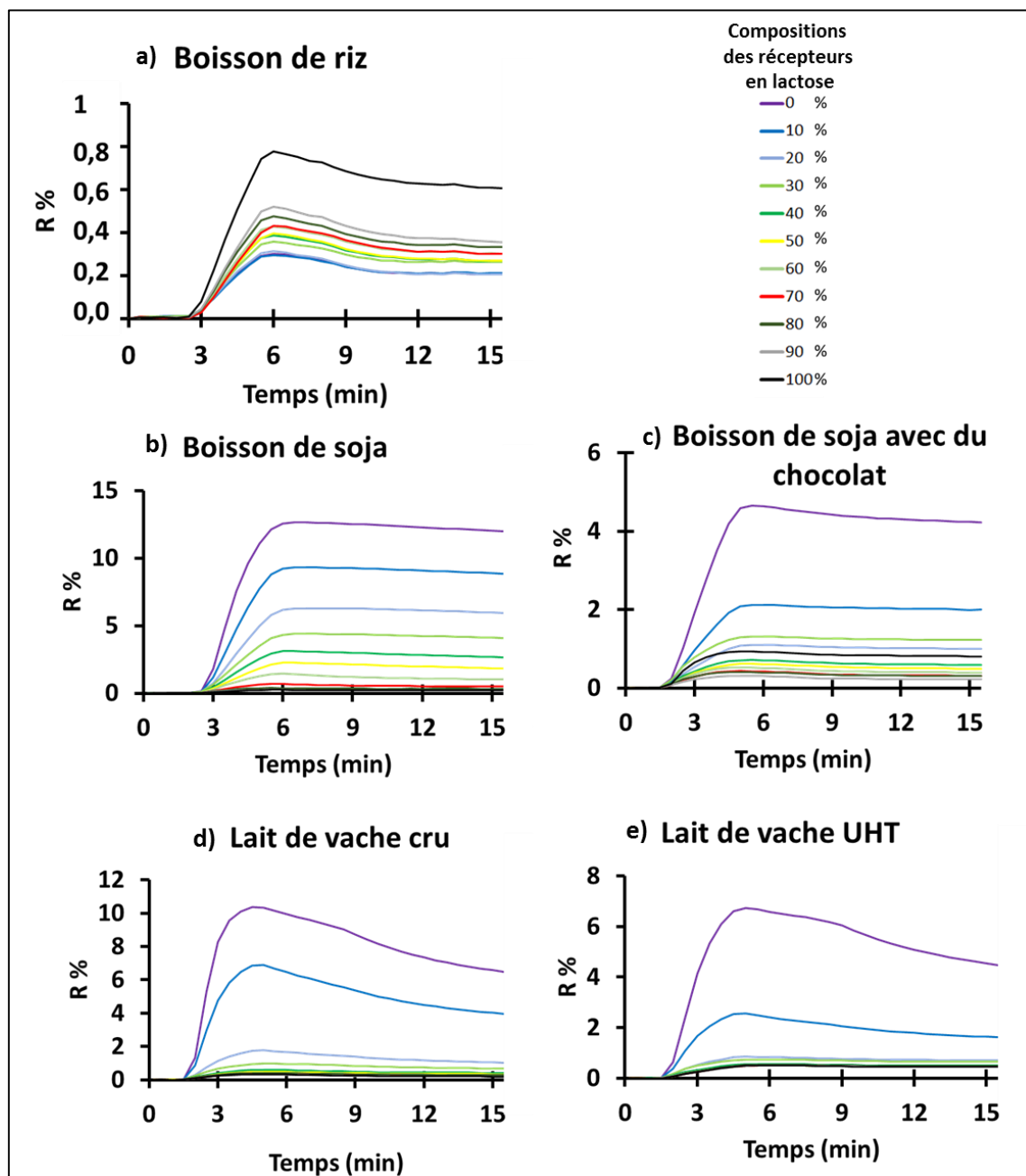


Figure 3-3 : Sensogrammes des échantillons obtenus avec notre eT. a) boisson de riz b) boisson de soja c) boisson de soja chocolat d) lait de vache cru e) lait de vache UHT. Chaque ligne indique la moyenne de réflectivité obtenue pour les 4 récepteurs combinatoires de même composition sur notre système de langue électronique.

La composition des récepteurs combinatoires permet de distinguer la boisson de riz des autres échantillons. Ce mélange révèle une meilleure affinité pour les récepteurs riches en lactose (BB1), à l'inverse des boissons de soja et des laits de vache qui montrent une meilleure affinité pour les récepteurs riches en lactose sulfaté BB2. L'intensité est de 0,6% pour le récepteur composé uniquement de lactose contre 0,2% pour celui composé uniquement de lactose sulfaté. Cette intensité de signal très basse est probablement due à la faible concentration en

protéines dans la boisson de riz, environ 17 fois moins importante que les autres boissons végétales, le système ayant été développé pour discriminer initialement des protéines pures.

Les boissons végétales de soja aromatisées ou non avec du chocolat présentent toutes deux un signal de réflectivité plus important pour les récepteurs pauvres en lactose mais se distinguent par leur affinité pour les récepteurs combinatoires. Pour la boisson de soja nature l'intensité de réflectivité mesurée est fonction de la proportion en lactose dans les récepteurs combinatoires. Ainsi l'intensité du signal, maximale pour le récepteur composé de 0% de lactose (BB1) avec une valeur de réflectivité à 12%, décroît lorsque la concentration, au sein des récepteurs, augmente en lactose. L'intensité est alors de 9% et 6% pour les récepteurs combinatoires composés respectivement avec 10 et 20% de lactose. Pour la boisson de soja aromatisée au chocolat, en revanche, on ne retrouve pas de proportionnalité entre le signal et la concentration en lactose au sein des récepteurs. Cette boisson présente une importante affinité pour les récepteurs combinés composés de 0 et de 10% de lactose avec une intensité d'environ 4 et 2% pour la réflectivité. En revanche, l'affinité pour les autres récepteurs combinatoires montre une affinité comprise entre 1 et 0,25% seulement et sont distincts les uns des autres.

Les échantillons de laits de vache, cru ou UHT, comme le lait de soja chocolat, décrivent une meilleure affinité pour les récepteurs combinés riches en lactose-sulfate, notamment pour ceux composés de 0% puis de 10% de lactose. En comparant la différence de signaux maximum obtenus entre ces deux récepteurs, le lait cru indique une diminution d'intensité de 30% contre 64% pour le lait stérilisé, comme le montre la Figure 3-3. Cette variation de signal entre les deux types de récepteurs est observable lors de la phase d'injection ainsi que lors de la phase de rinçage. Pour les autres récepteurs composés de plus de 10% de lactose, les signaux du sensogramme se confondent sur la représentation graphique. Cette faible affinité entre les laits et les récepteurs riches en lactose, peut-être due à un effet de compétition avec le lactose présent en abondance dans le lait de vache.

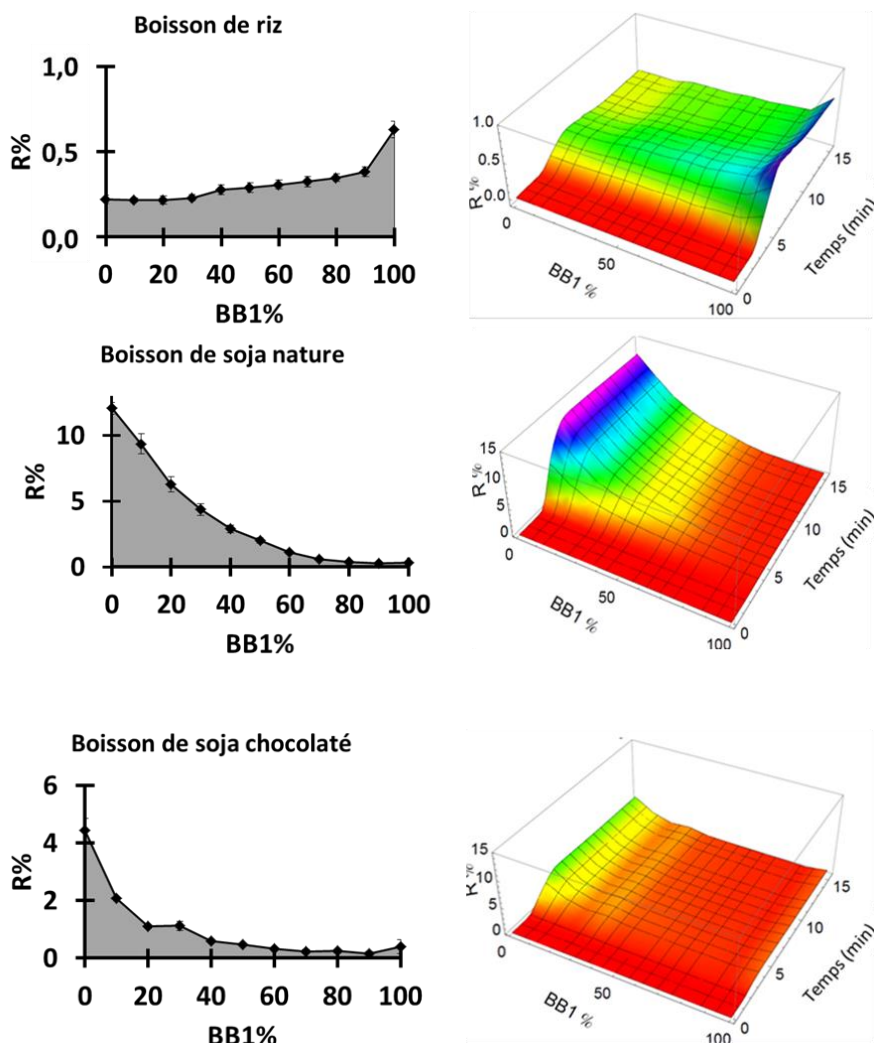
Remarque : Il est important de préciser que le pourcentage de réflectivité ne permet pas ici de quantifier les échantillons entre eux, mais de donner une information sur leur affinité avec les récepteurs combinatoires utilisés.

Les sensogrammes permettent de mettre en évidence la cinétique d'association et de dissociation des milieux complexes avec les récepteurs combinatoires pour distinguer les mélanges en trois groupes dans un premier temps. L'analyse de l'affinité des récepteurs (variation de l'intensité de signal entre la fin d'injection et la fin de rinçage), permet quant à elle de discriminer l'ensemble des échantillons testés, tout comme la composition des récepteurs combinatoires. Cependant il est parfois difficile de distinguer certains récepteurs,

c'est pourquoi nous utilisons les représentations continues en profils et en images cinétiques 3D pour générer des résultats plus visuels.

3.2.3 Différenciation des boissons par leurs profils continus 2D et leurs images 3D

Les profils continus 2D obtenus 13 minutes après le début de l'injection ainsi que les images de reconnaissance 3D ont été établis à partir des sensogrammes obtenus pour chaque échantillon et peuvent être considérés comme leurs « empreintes digitales ». La représentation des profils 2D permet ici une meilleure perception de l'affinité de chaque récepteur combinatoire pour le mélange analysé tandis que la représentation de l'image 3D met en évidence la cinétique et les différences d'intensité observées pour chaque récepteur par le contraste des couleurs par rapport à la Figure 3-4.



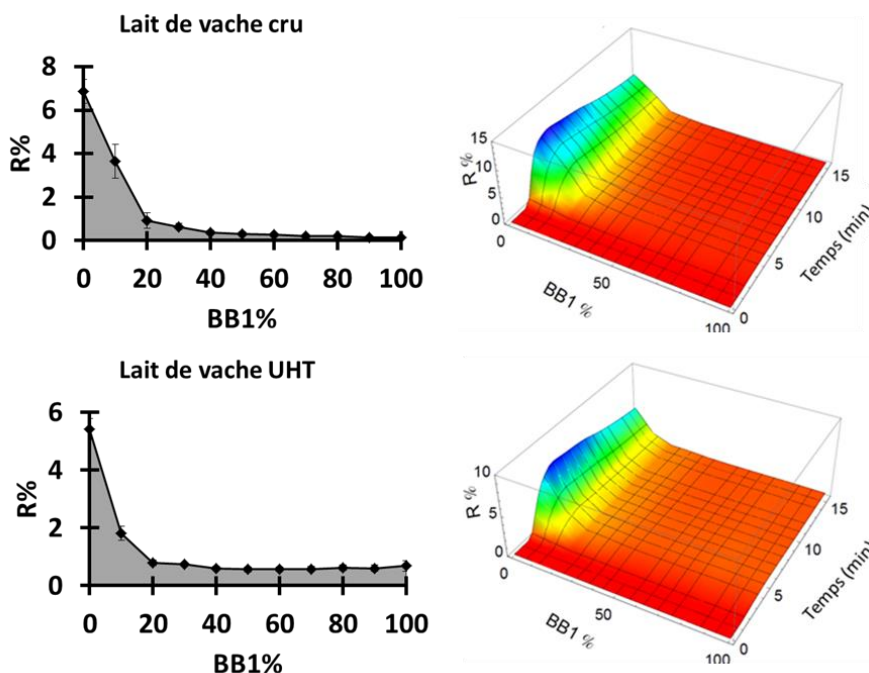


Figure 3-4 : Représentation des profils continus 2D (à la 13^{ème} minute) et des images 3D (cartographie) obtenues pour les différents échantillons sur un même prisme pour a) boisson de riz b) boisson de soja chocolat c) boisson de soja d) lait de vache cru et e) lait de vache UHT. Le profil 2D est obtenu à partir de la section correspondant à la 13^{ème} minute de la représentation cartographique (3D).

Comme nous avons pu l'observer lors de l'analyse des sensogrammes, la boisson de riz montre sur la Figure 3-4, une meilleure affinité pour les récepteurs riches en lactose, à l'inverse des autres boissons qui se lient davantage avec les récepteurs riches en lactose sulfate (BB2) donc pauvres en lactose (BB1). Pour la boisson de soja, les deux représentations continues permettent de mieux observer la diminution graduelle du signal de réflectivité lorsque la composition en lactose des récepteurs combinatoires augmente. Pour la boisson de soja aromatisée au chocolat, le profil 2D met également en évidence, une diminution importante de la réflectivité pour les récepteurs constitués de 0 à 20% de lactose, un plateau entre les récepteurs composés de 20 et de 30 % de lactose, suivi d'une nouvelle diminution du signal pour des récepteurs dont les ratios sont plus importants en BB1. Mais l'analyse des profils continus 2D et des images 3D discriminent davantage les échantillons de lait cru et de lait UHT.

En effet les profils du lait de vache cru et UHT décrivent tous les deux des similitudes, avec une importante diminution de réflectivité mesurée pour les récepteurs composés de 0 à 20% de lactose. Le lait cru présente, à 13 minutes, une diminution de la réflectivité passant de 7% à 3,5% puis 1% de réflectivité pour les récepteurs composés respectivement de 0, 10 et 20% de lactose (BB1). Le lait de vache UHT présente, quant à lui une réflectivité de 5,5% pour le récepteur composé uniquement de lactose sulfate et un signal d'environ 2% pour le récepteur composé de 10% de lactose.

Les récepteurs combinatoires, dont les signaux étaient confondus sur le sensogramme du lait cru et du lait UHT, sont distincts sur le profil continu. Pour le lait UHT, les récepteurs composés de plus de 20% de lactose montrent la même affinité, ce qui se traduit par un plateau à 0,8% de réflectivité. Pour le lait cru en revanche, les signaux de ces récepteurs continuent à décroître progressivement lorsque leur composition en lactose augmente, passant d'environ 1% pour le récepteur avec 20% de lactose à presque 0% pour celui composé uniquement de lactose.

En conclusion, les deux modes de représentations se complètent dans cette étude. En effet le profil continu 2D et l'image 3D permettent de discriminer des échantillons très similaires comme le lait de vache cru et le lait de vache UHT, notamment pour les récepteurs ne donnant pas des résultats significativement différents dans le cas des sensogrammes. Afin de montrer le potentiel de discrimination de notre système de langue électronique, une analyse statistique par analyse en composantes principales a été réalisée pour les 5 boissons afin de les classer.

3.2.4 Classification des boissons

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales a été réalisée sur les profils continus 2D obtenus lors de 4 injections aléatoires pour chacun des échantillons de laits de vache cru ou UHT, des boissons de soja nature ou chocolatée ainsi que de la boisson de riz. La Figure 3-5 montre que les boissons forment 3 regroupements distincts, dont l'un est constitué du lait de vache et de la boisson chocolat, qui se chevauchent en partie sur la représentation. La variance globale de la représentation est de 98,6% par rapport aux données d'origine, la perte d'information est donc faible avec 1,4%. Cette analyse statistique, montre que les échantillons de lait cru, de lait UHT et de boisson de soja chocolaté, se distinguent très faiblement les uns des autres à l'inverse des boissons de riz et de soja nature.

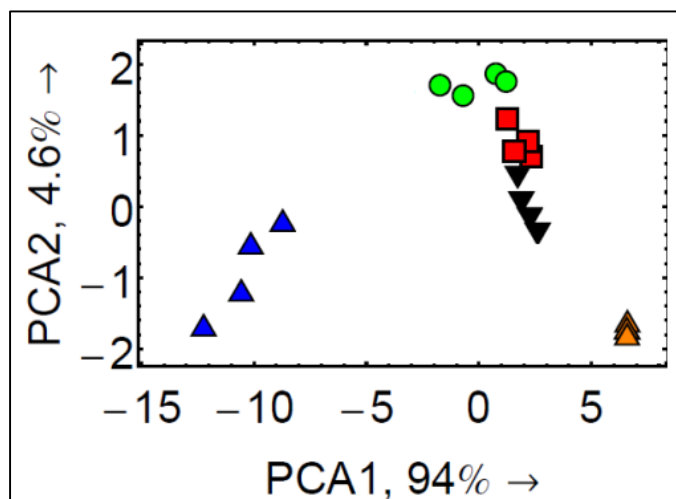


Figure 3-5 : Représentation du résultat d'analyses en composantes principales à partir des profils continus 2D pour les différents échantillons de lait de vache UHT (carré rouge ■) ; lait de vache cru (cercle vert ●), boisson de soja (triangle bleu ▲), boisson de soja chocolat (triangle noir ▼) et de boisson de riz (triangle orange ▲) répétées à 4 reprises.

Les échantillons ont ainsi pu être discriminés par leur affinité avec les récepteurs mais l'image continue 3D permet également de considérer les cinétiques d'association et de dissociation de chaque surface combinatoire. En effet nous avons pu déterminer que la phase de rinçage modifiait les signaux de réflectivité mesurés pour certaines solutions. C'est pourquoi, dans un second temps, une nouvelle PCA basée sur l'image 3D de chaque milieu devrait permettre de mieux séparer ces deux groupes. Afin de diminuer le nombre de variables (ou paramètres) analysées à 330, l'image 3D est réalisée à partir des profils 2D établis toutes les 30 secondes.

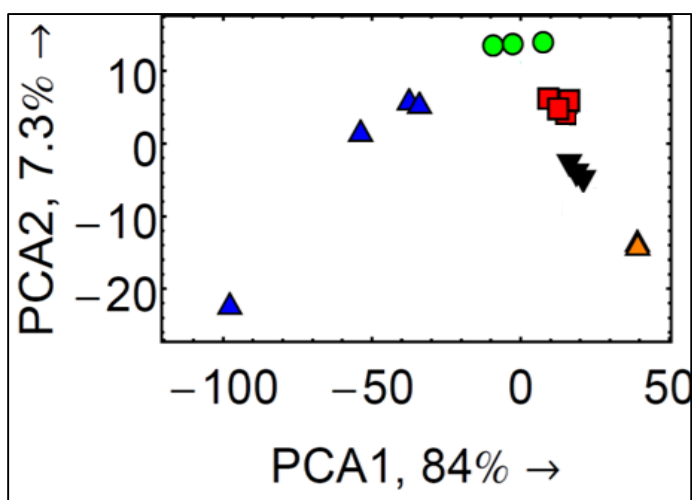


Figure 3-6 : Représentation du résultat d'analyses en composantes principales à partir des images 3D pour les différents échantillons de lait de vache UHT (carré rouge ■) ; lait de vache cru (cercle vert ●), boisson de soja (triangle bleu ▲), boisson de soja chocolat (triangle noir ▼) et de boisson de riz (triangle orange ▲) répétées à 4 reprises.

Comme le montre la Figure 3-6, la projection des images 3D présente une meilleure discrimination pour l'ensemble des boissons notamment pour le lait de vache UHT et la

boisson au soja chocolaté. Les 5 échantillons analysés sont clairement séparés et concentrés à l'exception du lait de soja nature dont le groupe plus diffus, révèle qu'un des échantillons de soja se distingue des 3 autres, ce qui n'était pas visible auparavant. La variance globale de cette nouvelle représentation est de 91,3%, ce qui est inférieure à la précédente mais malgré une perte d'information plus importante, l'analyse en composantes principales des images 3D permet de mieux discriminer les 5 boissons.

Cette PCA 3D est donc plus fiable et plus efficace pour classer les échantillons pour cette étude que la représentation établit à partir d'un temps donné. En effet celle-ci permet de considérer les phases d'association, de dissociation et d'équilibre de chaque récepteur, qui varient en fonction des boissons.

3.3 Suivi du vieillissement du lait

Afin de démontrer l'utilisation potentielle de notre langue électronique dans le domaine de l'agroalimentaire, pour les contrôles qualités par exemple, nous avons réalisé par la suite une étude sur le vieillissement du lait UHT soumis à des contaminations. En effet la forte dispersion des échantillons de lait observés dans la partie 3.1.2 laisse penser que l'évolution de signal des récepteurs serait liée au temps et donc au vieillissement du lait.

Au cours de cette expérience, le lait UHT est conservé sous agitation à une température ambiante de 25°C, après son ouverture. Des prélèvements de 1mL sont ensuite réalisés après une exposition à l'air de 1h, 24h, 48h et 72h. Cependant il n'est pas toujours possible d'effectuer directement les mesures des échantillons puisqu'une analyse dure environ une heure. C'est pourquoi les prélèvements sont analysés directement ou alors congelés à -20°C. En effet une étude préliminaire a montré que la congélation des échantillons de lait n'avait pas d'impact sur les mesures effectuées par la langue électronique, les signaux issus des deux modes de conservation étant sensiblement identiques. Les prélèvements peuvent ainsi être effectués à un temps donné puis analysés à posteriori après congélation de l'échantillon.

Comme illustrée dans la Figure 3-7 la plus forte réflectivité est mesurée à 48h avec une intensité de 11,8% pour la surface combinatoire constituée uniquement de lactose sulfate, tandis qu'elle est de 4% et 5,5% pour le temps 1h et 24h ; elle descend ensuite à 1,5% pour le prélèvement à 72h. Le milieu complexe évolue dans sa composition en fonction du temps de stockage à l'air ambiant. Ces variations de compositions sont mesurables comme le montrent les images 3D obtenues pour les prélèvements à 48 et 72 heures. Cependant il n'est pas possible de distinguer les échantillons prélevés à 1 et 24 heures que ce soit par les représentations des profils continus 2D ou des images 3D. En revanche à 72h, la caséine contenue dans le lait avait coagulé ou précipité donnant ainsi du « lait caillé ». Cette très forte diminution d'intensité à

72h peut être liée à la détérioration naturelle du lait et de ses protéines ou par sa contamination en milieu ouvert.

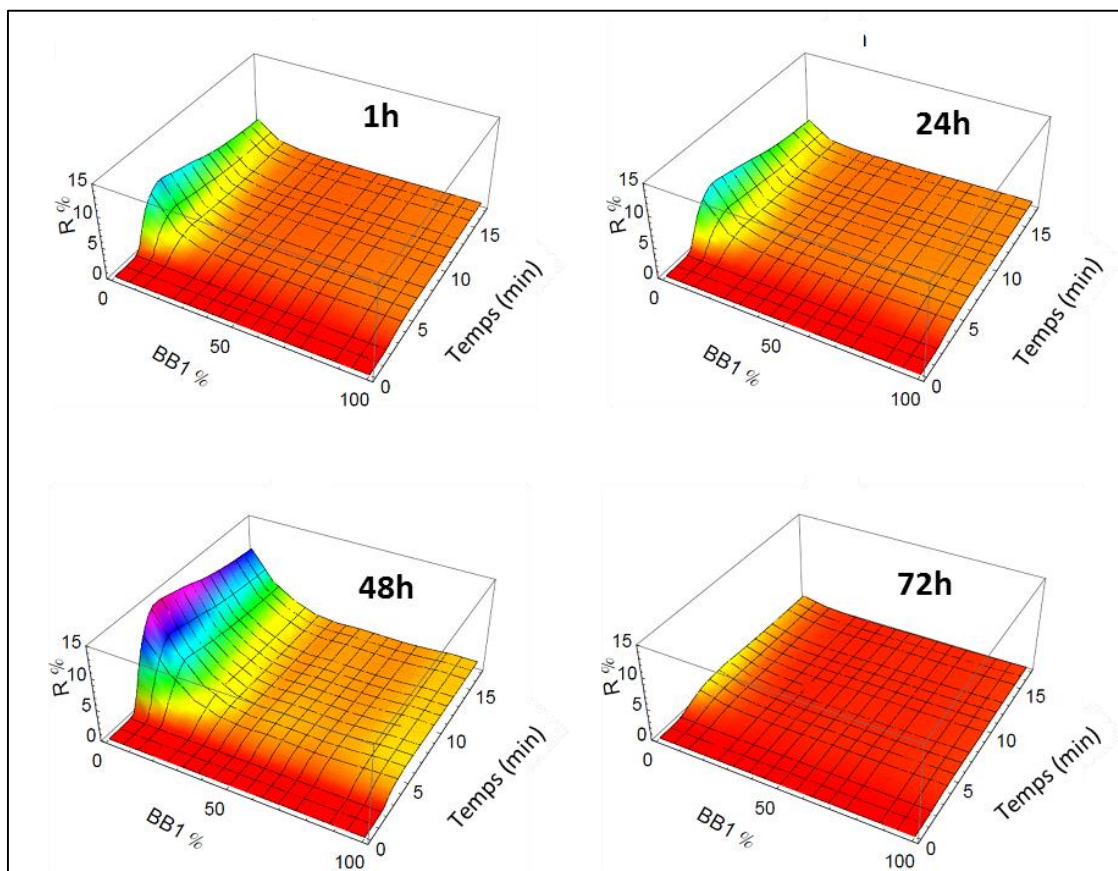


Figure 3-7 : Images 3D pour le lait UHT après 1 ; 24 ; 48 et 72 heures d'ouverture et de conservation à 25°C à l'air ambiant.

Dans cette étude, chaque prélèvement de lait est analysé à 6 reprises après un mode de conservation au réfrigérateur ou au congélateur. La Figure 3-8 présente les résultats obtenus par l'analyse en composantes principales à partir des données des profils de reconnaissance à 13 minutes. Le nombre de données observé est plus important pour le prélèvement à 1h puisque l'étude prend en compte le mode de conservation de l'échantillon après le prélèvement. La représentation met en évidence 3 groupes avec une variance globale des deux composantes de 99,2 %, ce qui indique une faible perte d'information par cette représentation. Le premier groupe est observé pour les extraits obtenus à 1h (congelés ou non) et ceux obtenus à 24 heures ; les autres groupes correspondent aux prélèvements à 48 heures et à 72 heures. L'étude statistique PCA confirme les observations réalisées sur les images 3D ainsi que l'impossibilité de distinguer le lait avant 24h de conservation à l'air. Le manque de séparation des prélèvements à 1 et 24h, peut s'expliquer par l'absence de modifications significatives du milieu complexe. En revanche après un vieillissement de 24 heures à l'air libre, il est possible

de distinguer les groupes et donc le vieillissement du lait, d'où l'utilisation potentielle de ce système de langue électronique en complément des contrôles qualités standard.

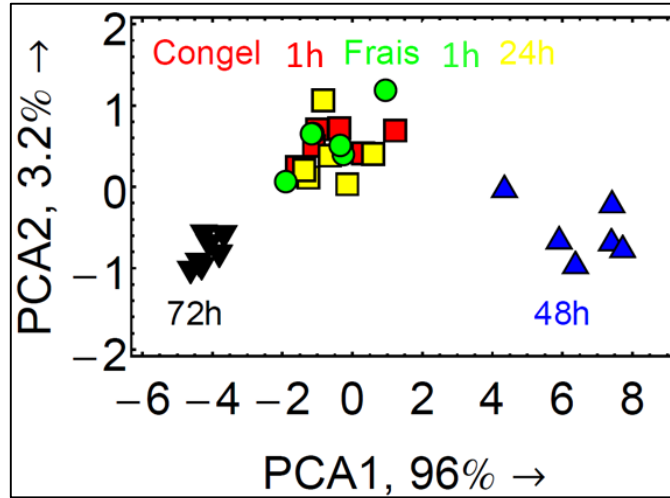


Figure 3-8 : Représentation de données obtenues après 6 injections pour chacune des conditions de vieillissement du lait UHT après 1 ; 24 ; 48 et 72 heures. Les deux composantes principales représentent 99,2% de la variance à partir des données d'origine.

3.4 Etude de stabilité et de reproductibilité du système

Comment pour les biocapteurs, la stabilité et la reproductibilité du système sont des critères importants pour évaluer leurs performances. Nous avons au cours de notre étude testé ces deux paramètres en utilisant une protéine de référence ; *Erythrina cristagallis* Lectin (ECL).

Pour étudier la stabilité de l'ensemble de récepteurs lors de sa conservation au réfrigérateur à 4°C, nous avons réalisé durant 6 mois des mesures répétées avec la protéine de référence (Figure 3-9). Nous comparons ensuite les profils continus 2D entre différentes injections afin d'établir la corrélation des résultats. Grâce à la continuité des profils générés par notre eT, nous pouvons établir l'analyse des signatures dans leur globalité plutôt qu'une comparaison récepteurs par récepteurs. Le coefficient de corrélation (C_{12}) est défini selon l'équation suivante :

$$C_{12} = \frac{\sum_{BB1\%} R_1(BB1\%) R_2(BB1\%)}{\sqrt{\sum_{BB1\%} R_1^2(BB1\%) \sum_{BB1\%} R_2^2(BB1\%)}}$$

Dans le cas de cette étude, ce coefficient de corrélation est supérieur à 95%, ce qui montre la très bonne stabilité des récepteurs lors d'une conservation au réfrigérateur à 4°C pendant une période minimale de 6 mois.

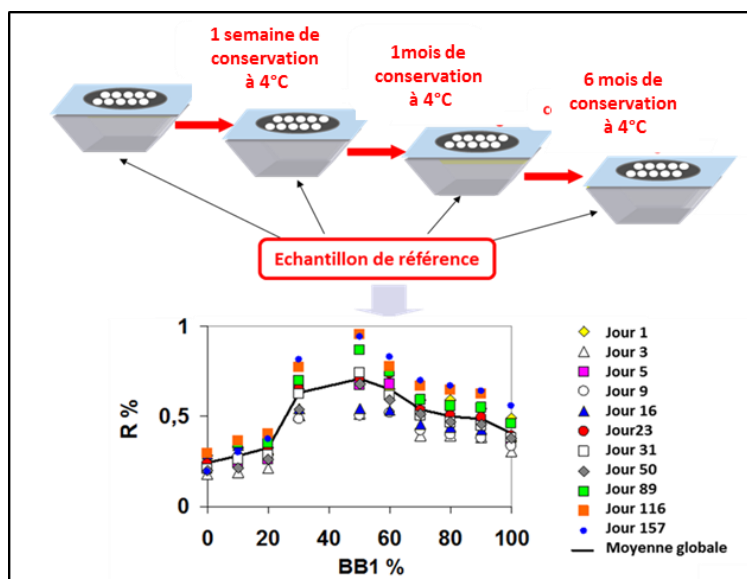


Figure 3-9 : Schématisation des études menées pour caractériser la stabilité des récepteurs combinatoires lors de la conservation du prisme au réfrigérateur à 4°C.

Nous avons également étudié la reproductibilité des mesures selon la même approche. Pour ce faire, les expériences ont été menées par plusieurs injections aléatoires de la protéine ECL au cours d'analyses des milieux complexes, soit sur un seul et même prisme, soit sur 4 prismes différents (Figure 3-10). Nous avons pu ainsi établir que la reproductibilité du signal entre les mesures sur un même prisme était de 98 % tandis que sur des prismes différents cette corrélation était supérieure à 93%. Ces résultats montrent donc une très bonne reproductibilité du système.

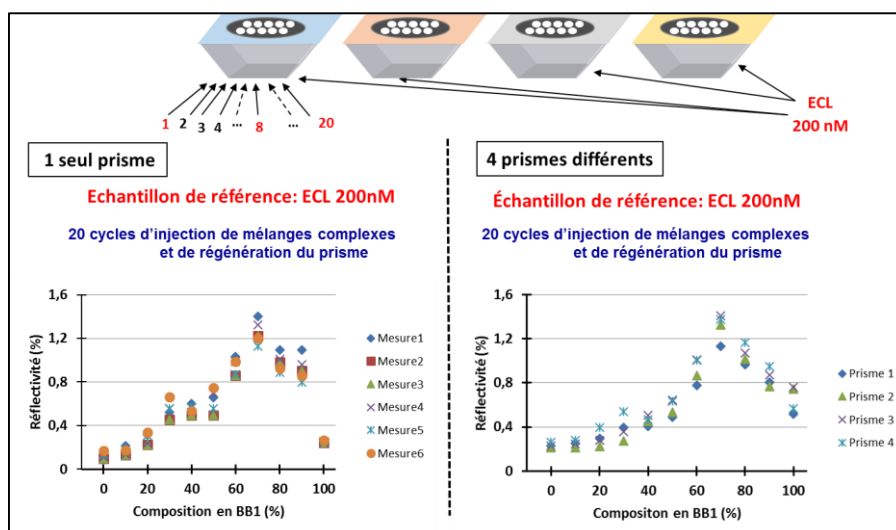


Figure 3-10 : Schématisation de l'étude sur la reproductibilité des résultats sur un même prisme et sur différents prismes.

Remarque : La différence de profils entre les provient d'un lot commercial différent de notre protéine de référence.

Conclusion

Cette étude a montré que les récepteurs combinatoires composés seulement de deux briques de bases, sont capables de répondre différemment aux milieux complexes avec une bonne sélectivité. Nous avons ainsi pu grâce aux profils continus 2D et aux images cinétiques 3D, différencier et classer divers types de boissons comme le vin, la bière, et le lait. Une amélioration doit toutefois être apportée au système par l'introduction de nouvelles briques de bases pour mieux discriminer les divers types de vins et de bières (pauvre en protéines). En revanche le dispositif est bien adapté pour des laits d'origines végétales ou animales souvent riches en protéines (boisson de soja, lait de vache, boisson de riz, *etc.*). Ce dispositif initialement créé pour l'analyse de protéines a également prouvé son efficacité pour le suivi du vieillissement du lait, qui présente une variation de composition au cours du temps soit en raison d'un vieillissement naturel de ces composants, soit en raison d'une contamination bactérienne. Les divers résultats de ce chapitre illustrent l'application potentielle de notre système de langue électronique dans le secteur de l'alimentaire.

Chapitre 4

*Analyse de bactéries
par le système de
langue électronique*

4 Analyse de bactéries par le système de langue électronique

Dans le chapitre précédent, nous avons illustré l'utilisation de notre système de langue électronique pour la discrimination de milieux complexes tel que le lait. Afin de démontrer le potentiel de ce système pour les contrôles de sécurité alimentaire, nous avons choisi d'orienter le reste de notre étude pour la détection et la discrimination des bactéries. Dans un premier temps nous avons optimisé les paramètres fluidiques du système, puis nous avons réalisé une étude de faisabilité avec des bactéries non pathogènes. Le système a ensuite été appliqué aux bactéries pathogènes couramment recherchées et contrôlées dans le domaine de la santé ou de l'agroalimentaire lors de contrôles qualités par exemple.

Dans le secteur alimentaire, les analyses qualités s'intéressent à plusieurs aspects des produits étudiés. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'aspect sensoriel généralement identifié à l'aide d'un panel de testeurs par l'analyse de la texture, des arômes, de la saveur des produits. Le contrôle de conformité du produit est également étudié par les contrôles biochimiques afin de déterminer les différents composants comme les protéines, les matières grasses et leur quantité. Enfin les contrôles microbiologiques permettent quant à eux de vérifier l'absence de contamination et s'il y a lieu d'identifier et de dénombrer les micro-organismes contaminants. L'ensemble de ces contrôles établit la traçabilité des produits au cours de la production et permet de s'assurer de la bonne conformité vis-à-vis des normes et réglementations en vigueur c'est à dire tout au long de la chaîne de production, de distribution, de commercialisation et de conservation ou plus couramment dit « de la fourche à la fourchette ». Les langues et nez électroniques représentent dans le secteur agroalimentaire, des méthodes alternatives et complémentaires pour l'analyse sensorielle ou pour la détection et l'identification des éventuels contaminants alimentaires (micro-organismes, toxines, virus). Les bactéries sont très largement recherchées et étudiées dans les domaines de l'environnement et de la santé comme le montre la Figure 4-1.

.

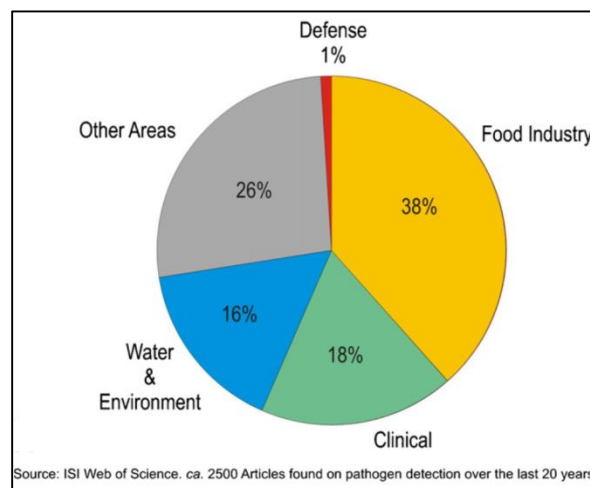


Figure 4-1: Représentation de la répartition des études menées sur la détection de micro-organismes pathogènes dans les secteurs de l'industrie agroalimentaire, de l'environnement, du domaine médical [162].

Les maladies d'origine alimentaire (infectieuses ou toxiques) sont généralement causées par des bactéries, des virus, des parasites ou des substances chimiques (pesticides, additifs), lors de la consommation d'aliments contaminés tels que de l'eau ; de la viande crue ou insuffisamment cuite ; du lait ou des légumes crus. Les bactéries pathogènes d'origine alimentaire affectent des millions de personnes chaque année avec parfois des effets graves et mortels. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a récemment publié un rapport notifiant que depuis 2010, 22 maladies entériques d'origine alimentaire étaient la cause de plus de 582 millions de cas d'intoxication et de 351 000 décès. Les agents pathogènes entériques responsables de la plupart des décès étaient issus de *Salmonella enterica* Typhimurium avec 52000 décès tandis que les souches *Escherichia coli* entéro-pathogènes et les norovirus étaient responsables respectivement de 37000 et 35000 décès. Les contaminations microbiennes représentent une préoccupation majeure d'un point de vue sanitaire mais également économique. En 2011, les autorités sanitaires européennes faisaient état de plusieurs milliers de personnes intoxiquées et de 47 décès, suite à la contamination de graines germées par une souche *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC). Cette épidémie aurait généré des pertes pour les agriculteurs et les industries, évaluées à plus de 1,1 milliard d'euros [163].

C'est pourquoi au cours des dernières décennies, de nombreuses recherches en microbiologie ont été entreprises afin d'élaborer des méthodologies, de développer des procédés d'automatisation et de nouvelles techniques de détection plus rapides pour identifier les micro-organismes pathogènes dans le secteur de l'alimentaire et ainsi prodiguer des soins efficaces aux patients.

4.1 Méthodes de détection et d'identification des micro-organismes

L'identification des micro-organismes nécessite des connaissances sur leur morphologie, leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques afin de pouvoir déterminer le genre et l'espèce de bactéries. Cependant au sein d'une même espèce, la virulence d'une bactérie peut varier de manière importante [164] ou présenter une sensibilité différente aux médicaments [165]. Il est donc de plus en plus important de déterminer la souche étudiée par son typage c'est-à-dire par ses caractéristiques génétiques afin d'adapter les mesures à prendre en cas de contaminations et de sélectionner aux mieux les traitements administrés par exemple.

4.1.1 L'identification des micro-organismes

4.1.1.1 Caractéristiques phénotypiques

La morphologie

Les caractéristiques morphologiques décrivent visuellement la forme, la dimension, l'aspect et la coloration de colonies isolées (circulaire, jaune, blanche, opaque, translucide ...). L'analyse par microscopie optique permet de décrire la forme propre de la bactérie en coques (cercle) ou bacille (bâtonnet) et de déterminer la présence ou l'absence de peptidoglycanes sur la membrane externe par la réponse à la coloration de Gram qui peut être respectivement positive ou négative. Il est également possible de décrire l'organisation des bactéries entre elles (isolée ou en chaînette) ainsi que des caractéristiques particulières comme la présence de flagelle pour la locomotion qui s'organise de manière polaire ou péritriche (tout autour de la bactérie). La présence de pili est également un caractère important puisqu'ils permettent l'accroche des bactéries sur les muqueuses et conditionnent donc le pouvoir pathogène des bactéries. Cependant la description morphologique ne permet pas à elle seule d'identifier de manière unique chacune des bactéries existantes, c'est pourquoi cette analyse est complétée par d'autres tests phénotypiques de types biochimiques et physiologiques.

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques

Les réactions biochimiques impliquent la présence d'enzymes extracellulaires analysables comme la catalase, l'oxydase ou amylase. Ces réactions étudient également la capacité des bactéries à fermenter les hydrates de carbones comme le glucose, le sorbitol ou le mannitol. Ces tests de caractérisation biochimiques peuvent être effectués avec des systèmes en kits comme les galeries API®, illustrés dans la Figure 4-2 [166]. Les caractéristiques physiologiques représentent les conditions optimales ou les

mieux adaptées à la croissance comme la température, le pH, la concentration en sel, la croissance en milieu aérobie et/ou en anaérobie ou la croissance possible sur différents milieux contenant des antibiotiques.



Figure 4-2 : Photographie d'une galerie API® à l'issue des tests biochimiques pour identifier une bactérie *Escherichia Coli*.

Les propriétés sérologiques

Les caractéristiques phénotypiques peuvent également être étudiées afin de définir plus précisément l'espèce analysée par la réalisation de tests d'antigènes avec des anticorps spécifiques, c'est-à-dire par l'étude de leur sérotype. L'antigène O représente les oligo-saccharides constituant les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négative, c'est-à-dire la partie somatique des souches souvent pathogènes. Les antigènes H entraînent la reconnaissance des protéines thermolabiles des flagelles tandis que l'antigène K constitue les hydrates de carbone de la capsule.

L'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques permet d'identifier le genre et l'espèce du micro-organisme mais comme nous l'avons expliqué précédemment, il existe de nombreuses différences au sein d'une même espèce.

4.1.1.2. Caractéristiques génotypiques

Le génotypage permet d'identifier les différentes souches d'une même espèce. Il peut par exemple être établi par le pourcentage de bases nucléotidiques C et G dans une mole d'ADN mais cette méthode génère une donnée brute qui peut correspondre à plusieurs possibilités. Il est alors possible de réaliser des tests de complémentarités de séquences ADN sur des biopuces afin d'établir des pourcentages d'homologie par hybridation [167]. Ces tests d'homologie peuvent également être réalisés sur la séquence nucléotidique de l'ARN 16S, en général préféré pour effectuer une identification.

4.1.2 Méthodes de détection rapides

Les méthodes de détection rapides représentent l'élément clé de la détection et de l'identification des contaminations. Très diverses, ces méthodes peuvent se baser sur la détection de bactéries vivantes ou mortes au sein d'un système, sur des caractéristiques cellulaires particulières comme certaines protéines, acides gras ou encore sur des

caractéristiques génotypiques. Nous décrirons donc ici certaines méthodes de manière très brèves afin de montrer la diversité des techniques mises en œuvre pour la détection de micro-organismes.

4.1.2.1 Méthodes de détection basées sur la croissance

Ces techniques se basent sur la mesure des paramètres biochimiques et physiologiques dont les variations reflètent la croissance des micro-organismes. Elles offrent le moyen de détecter des contaminations bactériennes de manière non spécifique, et renseignent ainsi sur l'existence d'une contamination ou non. La première méthode est la mesure de la turbidité par spectrophotométrie, c'est-à-dire l'opacité du milieu. On décrit également la méthode de la bioluminescence de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) qui permet de doser l'ATP produit ou consommé par les micro-organismes [168] ; la calorimétrie qui mesure la chaleur produite par le catabolisme des organismes contaminants [169, 170]. Les méthodes électrochimiques d'impédance et de conductimétrie détectent les modifications du milieu de culture grâce aux ions ou aux variations de pression des gaz issus du métabolisme et accumulés dans le milieu de culture [171] comme le dioxyde de carbone [172].

4.1.2.2 Méthodes de détection basées sur la viabilité cellulaire

Ce second type de méthode ne nécessite pas d'étape de croissance particulière avant d'être mise en œuvre. Il existe par exemple la cytométrie en flux, qui permet d'analyser de manière optique un flux de cellules unique préalablement marquées ou non. Les marqueurs (substrats) introduits dans les cellules peuvent alors être clivés par des enzymatiques et générer des produits fluorescents [173].

4.1.2.3 Méthodes de détection basées sur les composants cellulaires

Il est également possible d'identifier les micro-organismes par les différents constituants de base des organismes avec la méthode de spectroscopie infrarouge ou avec la méthode de FAMES (Fatty Acid Methyl Esters) qui permet d'identifier par la chromatographie gazeuse les acides gras [172]. La spectrométrie de masse permet de décrire les éléments composant le micro-organisme par chauffage sous vide afin d'analyser les composés gazeux produits, c'est la méthode de MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight). L'étude des micro-organismes par la spectroscopie Raman est également possible mais elle nécessite la standardisation des méthodes de culture et de mesure puisque cette méthode Raman permet de décrire l'état physicochimique d'une bactérie évoluant, en fonction de l'âge du micro-organisme mais aussi de son environnement [174, 175].

Les méthodes de détection par immunologie, représentent également une des méthodes standard d'identification des bactéries pathogènes mais également des toxines produites par ces dernières [176]. Ces techniques se basent sur les interactions antigènes-anticorps et représentent par exemple les tests en

immuno-précipitation et immuno-enzymatique tels que les tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Toutefois elles ne permettent pas de discriminer les bactéries viables ou non (Pharmeuropa 2004).

4.1.2.4 Méthodes de détection basées sur les acides nucléiques

La détection basée sur le génome des micro-organismes (ADN ou ARN) est mise en œuvre pour discriminer différentes souches [177]. L'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est courante, cependant cette technique ne distingue pas les bactéries viables des bactéries mortes. Des agents dits intercalant peuvent donc être couplés à cette méthode PCR afin de pouvoir quantifier spécifiquement et au minimum quelques centaines de bactéries vivantes [178, 179]. D'autres techniques comme la méthode de Southern Blot, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé [180], les tests de compétition par sondes [181] ou le polymorphisme des fragments de restriction peuvent également être utilisées pour identifier des micro-organismes [182]. Les méthodes peuvent aussi se baser sur la détection de l'ARN comme nous l'avons expliqué précédemment.

4.1.2.5 Méthodes « Lab-on-chip »

Les méthodes de détection « Lab-on-chip » permettent de combiner plusieurs techniques de détection et d'identification en se basant sur les oligonucléotides, les protéines ou l'ADN. Au sein de notre laboratoire, une approche combinée de croissance microbienne statique « sur puce » et de détection par le système SPRi a été réalisée. Cette méthode de culture-capture-mesure permet grâce aux anticorps présents sur la surface de la puce de réaliser une détection spécifique des bactéries comme *Salmonella enterica* Entititidis, *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli* O157: H7, en seulement quelques heures [182-184]. Cette méthode brevetée a notamment donné lieu à la création d'une start up Prestodiag. Une autre approche basée sur l'utilisation de puces à sucre utilise cette même méthode de culture-capture-mesure avec le système de SPRi [185]. Cependant les souches comme *Escherichia coli* O157: H7 forment un biofilm à la surface des colonies bactériennes ce qui complexifie parfois les mesures statiques par la méthode de SPRi. De plus ces méthodes de détection se basent par exemple, sur une réponse spécifique entre des anticorps et les bactéries, ce qui nécessite la conception et la synthèse de ces anticorps pouvant être coûteuses et parfois longues. Il s'ajoute à ces premières difficultés, un problème de spécificité des anticorps utilisés pouvant générer de faux positifs (interférences) lors des analyses. Dans ce contexte l'utilisation de notre système de langue électronique s'avère être une méthode complémentaire. En effet les éléments sensibles utilisés sont de petites molécules, peu coûteuses, ne présentant pas de spécificité particulière et pouvant s'associer aux différentes cibles grâce à des interactions de type électrostatiques, hydrophobe-hydrophobe, hydrophile-hydrophile. Nous allons ainsi évaluer ce système pour la détection d'objets complexes tels que les bactéries et savoir si notre langue électronique permet de générer des motifs de reconnaissance uniques et pertinents pour chacune des bactéries étudiées.

4.2 Les Bactéries utilisées au cours de l'étude

4.2.1 Escherichia coli

Au cours de cette étude nous avons utilisé différentes souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Cette bactérie en forme de bâtonnet mobile, Gram-négatif appartient à la famille des entérobactéries. Ces dimensions sont entre 0,5 et 1 µm de largeur pour 2 à 4 µm de long (Figure 4-3a). L'espèce *E. coli* se caractérise physiologiquement et biochimiquement par aérobie et anaérobie facultative, une fermentation du lactose et du glucose mais l'absence d'oxydase (glucose + ; lactose + ; uréase - ; indole +, H₂S - ; citrate -). Cette bactérie se trouve couramment dans l'intestin des humains ainsi que ceux des animaux à sang chaud. La plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives, cependant certaines souches comme celles *E. coli* entéro-hémorragique (ECEH), peuvent causer des maladies d'origine alimentaire sévères lors de la consommation d'aliments contaminés. La souche la plus dangereuse responsable d'épisodes épidémiques avec des cas mortels est de sérotype O157 : H7. Elle est à titre d'exemple responsable, d'une épidémie au Japon en 1996, où 9578 cas d'intoxication alimentaire ont été recensés ainsi que 11 décès suite à la consommation de graines germées de radis.

4.2.2 Salmonella

Les salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, au genre *Salmonella* et sont l'une des principales causes de toxi-infections alimentaires dans le monde. Le genre *Salmonella* comprend deux espèces qui sont *Salmonella enterica* et *bongori* [186]. On dénombre plus de 2500 souches différentes de cette bactérie. Certaines sont spécifiques aux espèces animales comme *Salmonella Dublin* présente chez les bovins; et *Salmonella Choleraesuis* chez les porcs. Les souches *Salmonella enterica* Enteritidis et *Salmonella enterica* Typhimurium sont les souches les plus transmises de l'animal à l'Homme. Les caractéristiques morphologiques de *Salmonella* sont des bacilles droits mobiles de 2,0 par 5,0 µm (Figure 4-3b), à coloration Gram négatif et anaérobie facultatif (glucose + ; lactose - ; βgalactosidase - ; catase + ; oxydase - ; uréase - ; indole - ; H₂S + ; citrate +) [187].

4.2.3 Staphylococcus

Staphylococcus est un genre de bactérie coque à Gram positif, d'un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, immobile souvent groupé en amas ou en chaînettes. Le genre *Staphylococcus* regroupe 36 espèces dont les plus couramment isolées sont *Staphylococcus aureus* considéré comme le plus pathogène ; *Staphylococcus epidermidis*, espèce dominante sur la peau et *Staphylococcus saprophyticus* impliqué dans les infections urinaires [163].

4.2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Le *Staphylococcus aureus* est capable de dégrader de nombreux substrats et possèdent différentes enzymes permettant de les identifier biochimiquement comme la coagulase ; la lipase ; la phosphatase *etc...* (glucose + ; lactose + ; oxydase -, catalase + ; coagulase +). Parfois appelée « Staphylocoque doré », en raison de sa couleur jaune, cette espèce produit de nombreuses toxines et est fréquemment rencontrée en pathologie humaine. Cette espèce est majoritairement responsable des infections nosocomiales (infections contractées à l'hôpital), avec l'espèce *E. coli*, *S. aureus* se classe également comme étant la 2^{ème} bactérie responsable d'intoxications alimentaires en France, après les salmonelles [163].

L'apparition des antibiotiques a été une révolution dans le traitement des infections bactériennes cependant, très rapidement après leur utilisation, des souches résistantes sont apparues, comme celles résistantes à la pénicilline ou à la méticilline [188]. Nous avons, au cours de l'étude utilisé une souche sensible à la méticilline dite MSSA et une souche résistante à cet antibiotique dite MRSA.

4.2.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) est une bactérie Gram positive à oxydase et coagulase négative (glucose + ; lactose + ; oxydase -, catalase + ; coagulase -). *S. epidermidis* est l'un des cinq organismes les plus courants. Présent généralement sur la peau humaine, il peut provoquer des infections nosocomiales [189]. Certaines souches se développent de manière collective et génèrent la formation d'un biofilm rendant souvent inefficaces les traitements antibiotiques [190, 191].

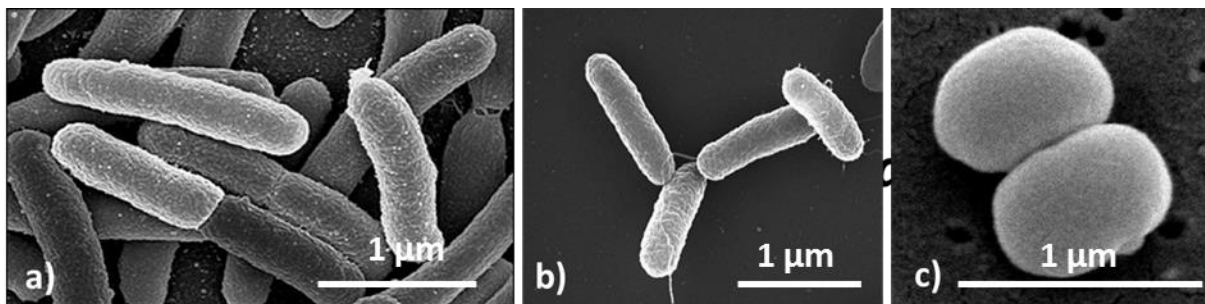


Figure 4-3 : Photographies des espèces a) *Escherichia coli* b) *Salmonella enteritica* et c) *Staphylococcus epidermidis*

4.3 Procédures générales d'étude des bactéries

4.3.1 Mise en culture des bactéries

L'ensemble des bactéries est mis en culture sur la nuit selon la même méthode. Une colonie est introduite dans un milieu de culture standard, le TSB (Tryptic Soy Broth) à une température de 37°C sous agitation à 150 rotations par minute (rpm). Après cette phase de croissance, les bactéries sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation puis rincées à 3 reprises par l'alternance de centrifugation à 14600 rpm, d'élimination du surnageant et, de remise en suspension du culot bactérien dans la solution tampon d'HEPES. La concentration approximative de la suspension est obtenue par mesure de l'absorbance en McFarland avec le dispositif Densimat® de BioMérieux, puis de manière plus précise par comptage du nombre de colonies sur milieu gélosé TSA (Trypticase Soya Agarose) après 24h d'incubation à 37°C.

4.3.2 Procédure d'analyse

L'analyse des bactéries est réalisée dans un milieu tampon (HEPES) à une concentration d'environ 10^7 bactéries.mL⁻¹, lue par absorbance. Dans un second temps Tout comme lors de l'analyse de milieux complexes, nous effectuons tout d'abord des injections de la protéine de référence ECL (200 nM) à divers moments de l'expérience. Nous réalisons nécessairement des injections en début et en fin d'expérience, ainsi que de manière aléatoire durant l'ensemble de l'expérience.

L'injection de l'échantillon de bactéries dure quant à elle 30 minutes à un débit faible de 0,52 $\mu\text{L.s}^{-1}$ (soit environ $9,4 \cdot 10^6$ bactéries injectées), puis cette étape est suivie d'une phase de rinçage de 10 minutes correspondant à l'injection de la solution tampon sans bactéries au même débit. Ensuite une seconde phase de rinçage est réalisée pendant 20 minutes à un débit environ 3 fois plus important que précédemment ($1,56 \mu\text{L.s}^{-1}$) ce qui permet d'éliminer complètement les bactéries déposées sur les récepteurs combinatoires par simple adsorption.

Remarque : Le détermination des débits fluidiques est décrite par la suite de manière plus précise.

4.3.3 Procédure de régénération et de conservation du prisme

La régénération du prisme est réalisée par injection d'une solution de SDS à 2% comme lors de l'analyse des milieux complexes. En fin d'expérience l'ensemble du système (tube fluidique, cuve et prisme) est mis en contact durant 45 minutes avec une solution d'éthanol à 70% afin de dégrader les bactéries pouvant être encore contenues dans le système après les multiples lavages au SDS. Le prisme est rincé à l'eau distillée puis séché sous un flux d'argon pour être stocké à 4°C au réfrigérateur jusqu'à sa prochaine utilisation.

4.4 Optimisation des paramètres fluidique d'étude des bactéries

A la différence des protéines et des milieux complexes étudiés précédemment par notre système, les bactéries sont des objets complexes plus volumineux, plus lourds et pouvant être mobiles. Nous avons donc réalisé une étude préliminaire afin d'optimiser les paramètres fluidiques de notre système de langue électronique à savoir la géométrie et la profondeur de la cuve ainsi que le débit fluidique.

Pour cette étude nous avons sélectionné deux souches bactériennes ; l'une de forme circulaire (coque) *Staphylococcus epidermidis* sans flagelle, l'autre en forme de bâtonnet avec *Escherichia coli* pouvant se mouvoir dans le milieu grâce à des flagelles péritriches. Pour les bactéries qui ne possèdent pas de flagelles pour nager, la diffusion dans le milieu est réalisée lentement par sédimentation ou par mouvements browniens. Les caractéristiques morphologiques différentes entre les espèces choisies permettent de définir les caractéristiques fluidiques de l'étude les plus adaptées, à savoir:

- la forme de la cuve (hexagonale ou circulaire)
- la profondeur de cuve
- le débit fluidique

L'ensemble de ces paramètres permet de contrôler l'homogénéité du volume contenue dans la cuve plus particulièrement lors de l'injection et ainsi d'améliorer l'interaction entre les bactéries et les récepteurs combinatoires.

4.4.1 Sélection de la forme de la cuve fluidique

Nous avons testé dans cette étude préliminaire des cuves circulaire et hexagonale en PEEK, représentées dans la Figure 4-4 afin d'établir la géométrie la mieux adaptée pour notre système.

Nous avons dans un premier temps utilisé une cuve circulaire de 1,2 cm de diamètre et profonde de 1,5 mm mais des difficultés ont été rencontrées lors des expériences. En effet l'important volume de la cuve généré par sa profondeur a rendu impossible l'élimination des bulles pouvant être introduites lors de l'installation du système ou lors de l'analyse d'échantillons. Ces bulles pouvaient de plus s'établir soit à distance de la surface du prisme c'est-à-dire au sommet de la cuve modifiant par conséquent l'homogénéité du système ; soit sur la surface du prisme modifiant par conséquent l'indice du milieu. Par la suite les problèmes rencontrés ont été résolus en utilisant une cuve de géométrie hexagonale. Nous avons donc étudié 3 cuves hexagonales de profondeurs différentes de 0,1 mm, de 0,3 mm et de 0,5 mm correspondant respectivement à un volume dans la cuve de 10 μL , de 31 μL et 52 μL .

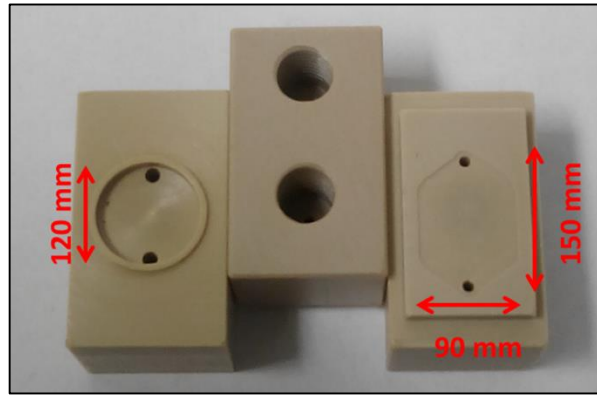


Figure 4-4 : Photographie des géométries utilisées pour les cuves

4.4.2 Optimisation de la profondeur de la cuve

Après avoir défini la géométrie de la cuve, nous avons étudié les réponses de deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* aux différentes profondeurs de cuve sous un débit de $1,56 \mu\text{L.s}^{-1}$. Les variations d'intensités mesurées pour une concentration bactérienne de 10^7 bactéries. mL^{-1} sont présentées dans la Figure 4-5, et montrent que notre système eT réagit de manière distincte en fonction des espèces analysées. De plus on observe que l'intensité de signal dépend de la profondeur de la cuve utilisée ainsi que de la souche bactérienne étudiée mais que l'allure du profil généré reste constante notamment pour *S. epidermidis*.

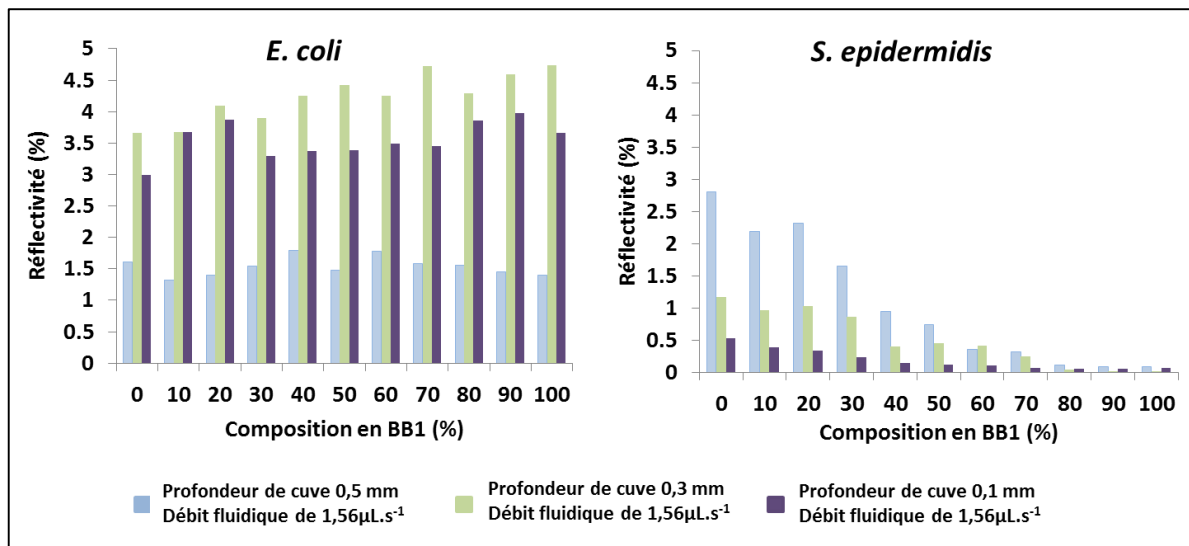


Figure 4-5 : Histogrammes représentant la variation d'intensité mesurée à un débit fluidique $1,56 \mu\text{L.s}^{-1}$ avec différentes profondeurs de cuves de 0,5 ; 0,3 et 0,1 mm à la fin du r.

En effet pour l'espèce *E. coli*, la cuve de 0,3 mm de profondeur permet d'obtenir une intensité de signal plus importante tandis que pour l'espèce *S. epidermidis* c'est la cuve de 0,5 mm de profondeur qui semble la plus adaptée. Il est possible que ces différences soient liées à la morphologie de bactéries, puisque les simulations avec le logiciel COMSOL ont montrés que les flux inférieurs

à $20\mu\text{L.s}^{-1}$ sont en théorie homogènes au sein des différentes cuves pour des molécules sphériques.

La souche *E. coli* en forme de bâtonnet, se déplace grâce à ses flagelles. Elle alterne une phase de « nage » rectiligne brève avec une phase de culbutes « tumble » permettant à la bactérie de se retourner mais pas d'avancer. Malgré la capacité de chimiotaxie de l'espèce *Escherichia coli*, son déplacement est considéré comme aléatoire dans des milieux homogènes. Ainsi la probabilité de cette bactérie d'arriver à proximité de la surface des récepteurs diminue lorsque le volume dans lequel elle « nage » est très important, ce qui expliquerait la faible intensité de signal mesurée pour la cuve profonde de 0,5 mm. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe probablement un optimum de détection entre le nombre de bactéries *E. coli* « vues » par la surface des récepteurs et le flux générant un cisaillement. Dans notre cas, c'est la profondeur de cuve de 0,3 mm qui permet d'améliorer l'intensité du signal.

Pour la souche *S. epidermidis* en revanche l'augmentation du volume de la cuve semble améliorer l'intensité des signaux. Comme précédemment la morphologie peut expliquer ces variations si l'on assimile cette bactérie à une particule homogène et circulaire. Ainsi dans un volume, une particule circulaire est soumise à sa force de gravité, ce qui entraîne sa sédimentation. Cependant dans notre cas, la sédimentation peut être perturbée par le flux de liquide qui lui est perpendiculaire et entraîne l'élimination des bactéries avant qu'elle atteigne la surface du prisme. Cette perturbation est cependant diminuée lorsque le volume de la cuve est augmenté, ce qui permet de favoriser la sédimentation des bactéries. La vitesse de sédimentation, fonction du diamètre de la particule circulaire est définie par la relation de Stokes :

$$\text{Vitesse} = \frac{(\rho_P - \rho_F) \cdot g}{18\mu} \times D^2$$

Où D représente le diamètre de la particule ; μ la viscosité dynamique du fluide ; ρ_P et ρ_F respectivement la masse volumique de la particule et du fluide et g l'accélération de pesanteur.

Ainsi plus la profondeur de la cuve est importante plus les bactéries peuvent sédimenter à la surface de notre système, la vitesse du flux étant diminué. Cependant lors des injections dans la cuve la plus profonde (0,5mm), les réponses des plots en quadruplet de même composition ont montré un décalage temporel important de plusieurs minutes comme le montre la Figure 4-6, ce qui laisse à penser que ces variations de signal résultent d'une non-homogénéité de flux dans la cuve.

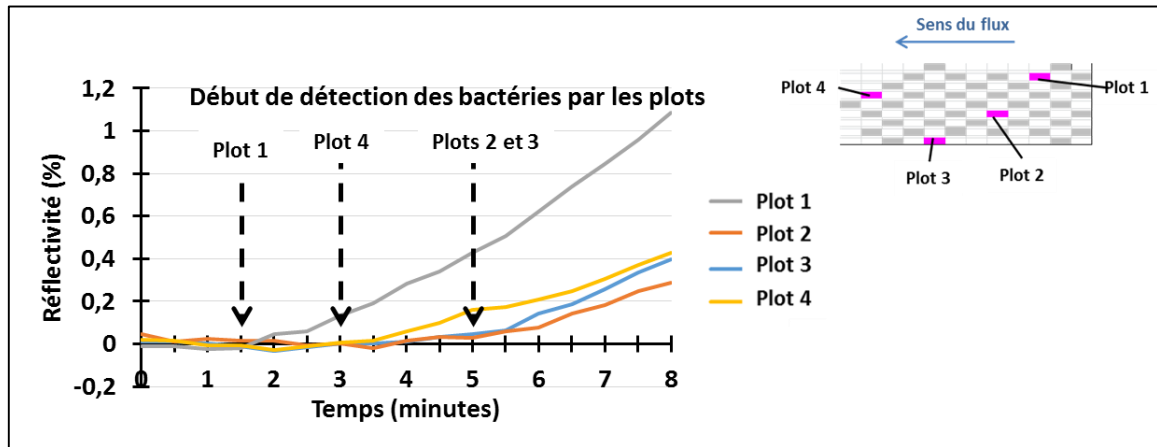


Figure 4-6 : Représentation pour illustrer la variation temporelle de détection de l'échantillon lors d'une analyse de *S. epidermidis* dans la cuve de 0,5 mm de profondeur sur les quadruplicats d'un même récepteur numérotés de Plot 1 à Plot 4.

Pour tester cette hypothèse, une solution fortement concentrée de lait a été injectée dans chacune des cuves de 0,3 et 0,5 mm de profondeur. Le lait est utilisé ici en raison de la bonne affinité avec le réseau de récepteurs combinatoires ainsi que pour sa couleur blanche opaque fortement visible sur l'imagerie SPR. Les résultats qualitatifs visuels présentés dans la Figure 4-7, confirment l'hypothèse de non homogénéité dans la cuve de 0,5 mm de profondeur durant l'injection de l'échantillon.

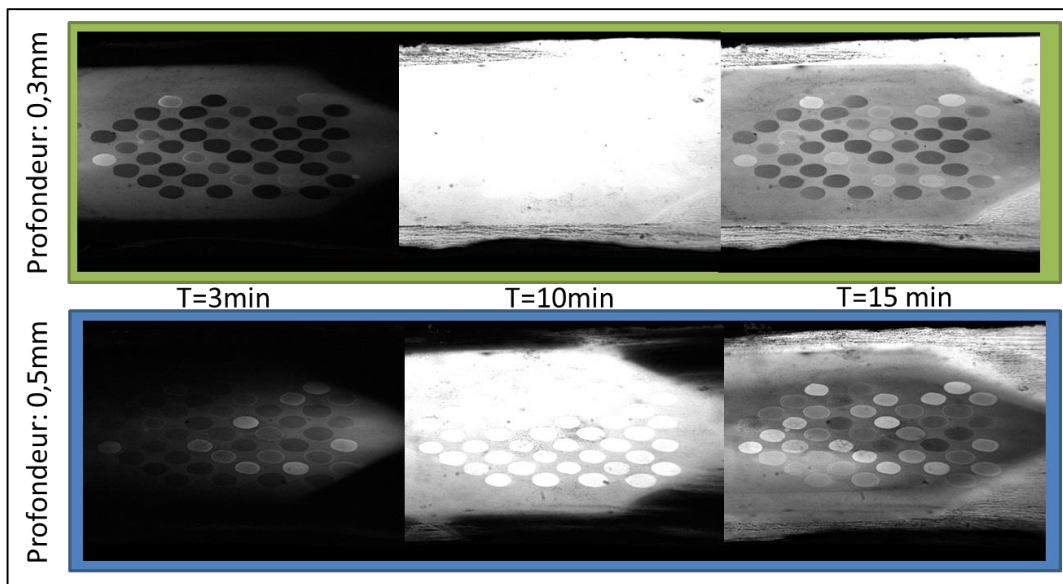


Figure 4-7 : Images différentielles d'un prisme lors de l'injection d'une solution de lait. Cette solution permet de saturer la surface du prisme et d'observer l'homogénéité du volume contenu dans la chambre réactionnelle. Deux cuves d'un volume de 31 μL et 51 μL ont été étudiées, seule la cuve de 0,3 mm de profond présente un volume homogène.

Par la suite une étude supplémentaire a été réalisée avec la cuve de 0,5 mm de profondeur en variant le débit fluidique. Les résultats (Figure 4-8) montrent que la réponse des récepteurs combinatoires à l'espèce *S. epidermidis* est très variable avec des barres d'erreur importantes et que la diminution du flux n'a pas amélioré la non-homogénéité de la solution dans la cuve. En conséquence cela peut générer des problèmes de reproductibilité pour notre système de langue électronique.

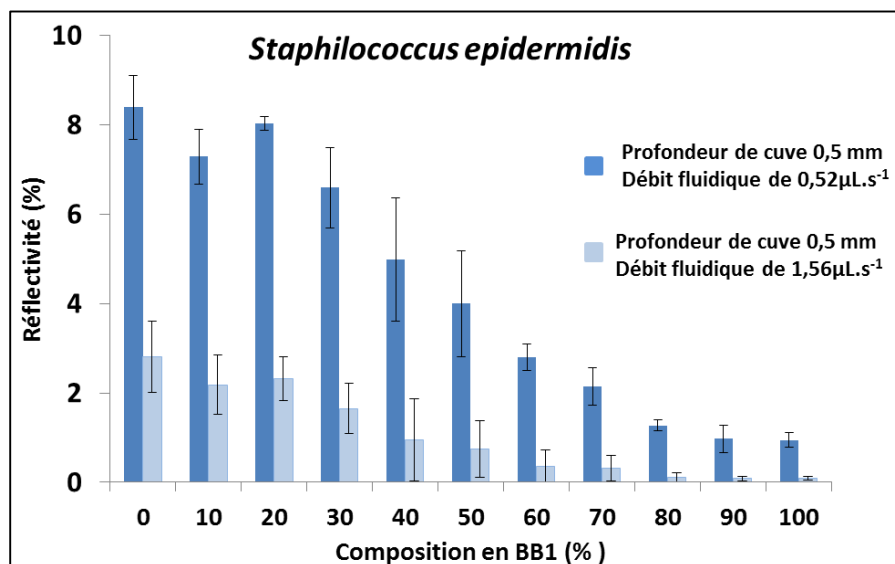


Figure 4-8 : Représentation des intensités de signal mesurées pour l'espèce *Staphylococcus epidermidis* à une concentration de $6,25 \cdot 10^6$ bactéries.mL⁻¹ dans du tampon HEPES avec la cuve hexagonale de 0,5 mm de profond et des débits différents de 0,52 et 1,56 µL.s⁻¹.

L'ensemble de ces études, nous confirme que la cuve hexagonale de 0,5 mm de profond n'est pas adaptée à notre étude des bactéries, en raison d'un problème de fabrication généré probablement par la précision des outils utilisés pour polir le PEEK. Nous sélectionnons donc la cuve de 0,3 mm de profondeur pour la suite de nos études avec les micro-organismes bactériens.

4.4.3 Détermination du débit fluide du système

Nous avons donc par la suite étudié l'influence du débit fluide sur l'intensité des signaux de chaque bactérie lors de l'utilisation d'une cuve hexagonale de 0,3mm de profond avec un débit lent de 0,52 µL.s⁻¹ et un débit plus rapide de 1,56 µL.s⁻¹ (environ 3 fois plus important).

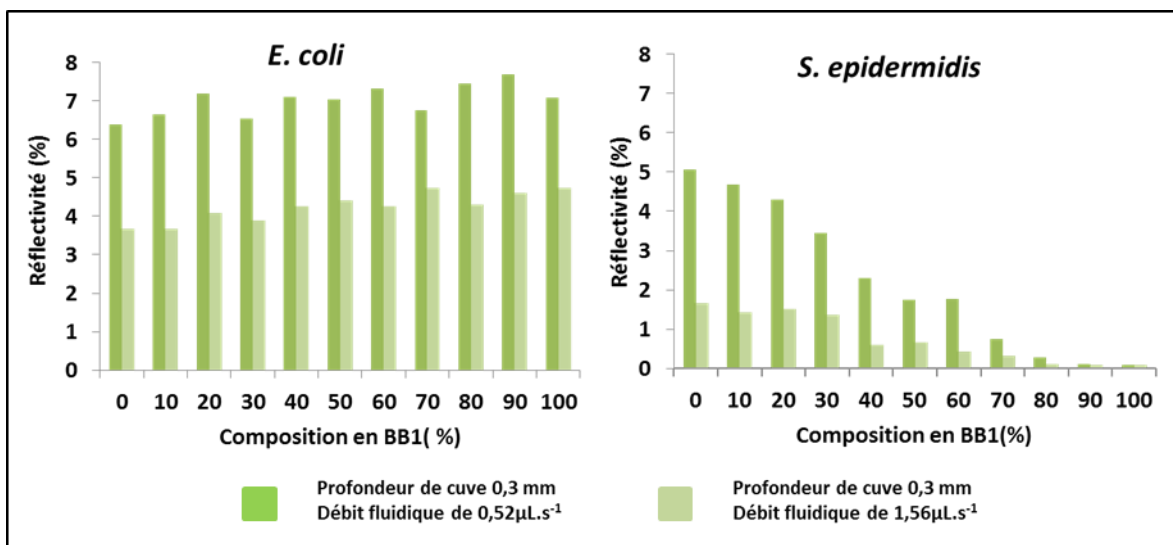


Figure 4-9 : Histogrammes des réflectivités mesurées pour les espèces bactériennes à une concentration d'environ $1 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ et $6,2 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ respectivement pour les espèces *E. coli* et *S. epidermidis*. Le paramètre étudié est ici le débit fluide de 0,52 µL.s⁻¹ ou de 1,56 µL.s⁻¹.

Comme illustré dans la Figure 4-9, lorsque le débit est lent, les deux souches présentent une plus grande intensité de signal donc un nombre plus important d'associations entre les bactéries et les récepteurs combinatoires.

En conclusion nous avons pu définir nos paramètres fluidiques avec l'utilisation d'une cuve hexagonale de 0,3 mm de profondeur et un débit de 0,52 $\mu\text{L.s}^{-1}$.

4.5 Etude de faisabilité d'analyse des bactéries

Afin de déterminer l'application potentielle de notre système de langue électronique, nous avons choisi de réaliser dans un premier temps une étude avec des bactéries non pathogènes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus epidermidis*. Selon l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) ces agents biologiques peuvent provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs, leur propagation dans la collectivité est peu probable et il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace. Dans un second temps des bactéries pathogènes de différentes espèces et souches *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Escherichia*, impliquées notamment dans les maladies d'origine alimentaire, ont été étudiées. Cet autre groupe de bactéries est défini par l'INRS comme pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs, leur propagation dans la collectivité est possible mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace.

Chacune des souches utilisées dans ce premier groupe de bactéries est identifiée au cours de cette étude par son numéro ATCC (American Type Culture Collection). Nous avons utilisé ici, 2 espèces de bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* ainsi que deux souches pour chacune des espèces : les souches *E. coli* 10 798 (décrite précédemment), *E. coli* 11 775 ayant le sérotype O1 :K1 :H7 d'une part ; et *S. epidermidis* 14 990 et *S. epidermidis* 12 228 d'autre part.

Le seuil de détection des bactéries est également à prendre en compte comme critère lors de nos mesures. Dans une première phase de notre étude, nous avons utilisé la souche *Staphylococcus epidermidis* 14990 à différentes gammes de concentrations pour déterminer la concentration minimale à laquelle nous pouvons détecter l'espèce *Staphylococcus epidermidis*. Les sensogrammes obtenus montrent que tous les récepteurs combinatoires présentent des affinités variables et que cette souche interagit préférentiellement avec les récepteurs riches en lactose sulfate (Figure 4-10). De plus l'intensité de signal augmente de manière proportionnelle en fonction de la concentration en bactéries.

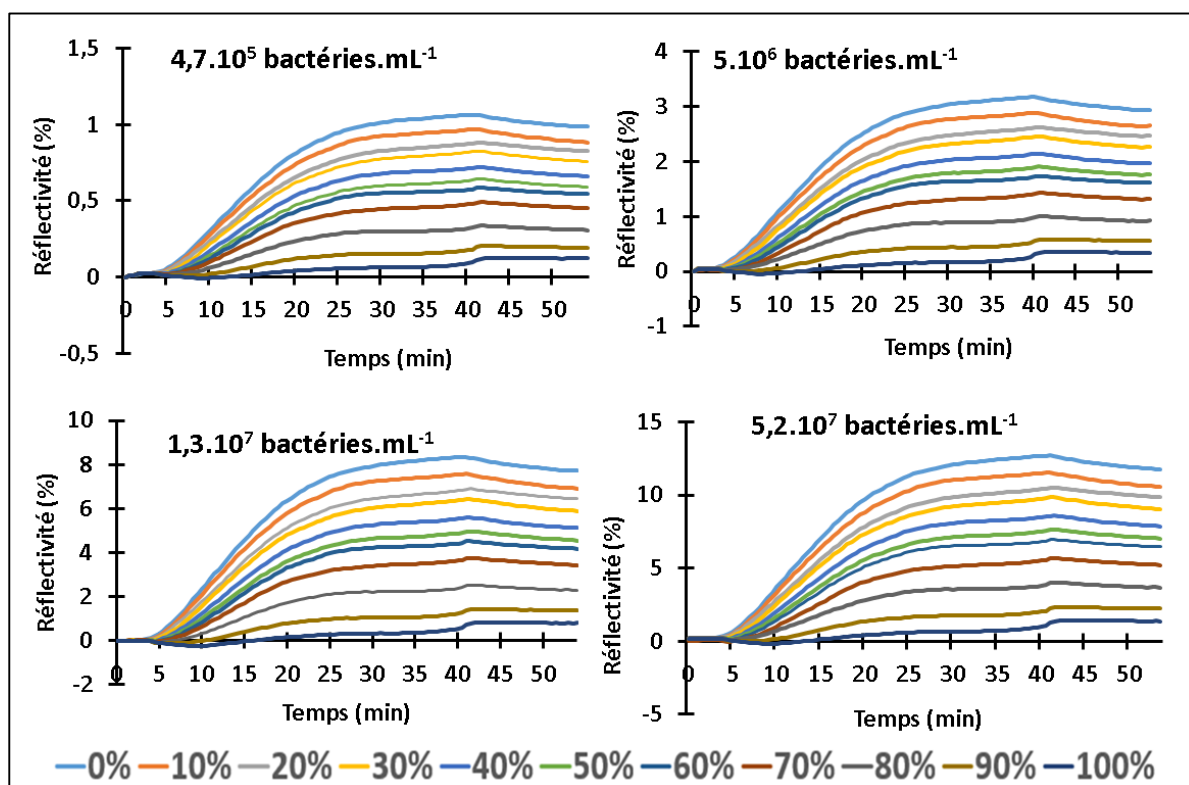


Figure 4-10 : Sensogrammes de la souche *Staphylococcus epidermidis* 14 990 analysée en fonction de différentes concentrations de bactéries dans la solution tampon HEPES.

La superposition des profils obtenus pour chacune des concentrations de bactéries montre plus clairement la relation entre l'intensité de signal et la concentration bactérienne, toutefois le profil de la souche est quant à lui inchangé (Figure 4-10). L'évolution d'intensité en fonction de la concentration en bactéries ainsi que la conservation du profil indiquent que notre système de langue électronique permettrait également de réaliser une quantification.

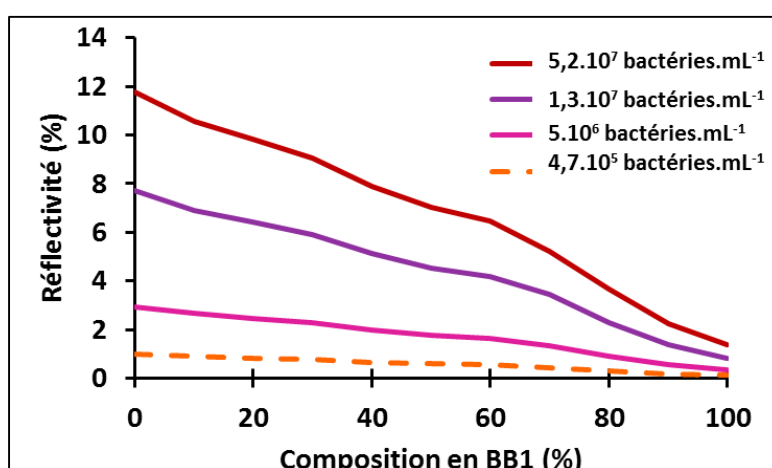


Figure 4-11 : Représentation superposée des profils 2D obtenus pour la souche *S. epidermidis* 14 990 en fonction des concentrations en bactéries analysées.

Cependant le sensogramme (Figure 4-10) et le profil (Figure 4-11) pour la plus faible concentration de $4,7.10^5$ bactéries.mL⁻¹ ne peuvent être validés en raison d'un rapport signal sur bruit inférieur à 3 %. En revanche le système semble être adapté pour l'analyse de la bactérie *S. epidermidis* dans une gamme de concentration supérieure à 1.10^6 bactéries.mL⁻¹. D'autres études ont montré au cours de cette thèse que le seuil de détection dépend de la nature des bactéries étudiées et qu'il peut être inférieur à 1.10^6 bactéries.mL⁻¹.

4.5.1 Discrimination inter-espèces

Une autre espèce de bactérie *E. coli* a ensuite été étudiée pour établir une comparaison entre deux espèces différentes et afin d'évaluer la capacité de distinction avec notre langue électronique.

Les sensogrammes de chaque souche (Figure 4-12), montrent une augmentation de signal de réflectivité lors de la phase d'injection (jusqu'à la 33^{ème} minute) due à l'association entre bactéries et récepteurs combinatoires. Lors de la 1^{ère} phase de rinçage à débit lent et de la seconde phase de rinçage à débit 3 fois plus rapide (commencée à la 43^{ème} minute) il n'y a pas de dissociation importante des bactéries de la surface. Nous avons donc établi nos profils 2D à la 55^{ème} minute c'est-à-dire à la fin du rinçage. On remarque cependant que notre système répond de manière très différente aux deux espèces *E. coli* et *S. epidermidis*.

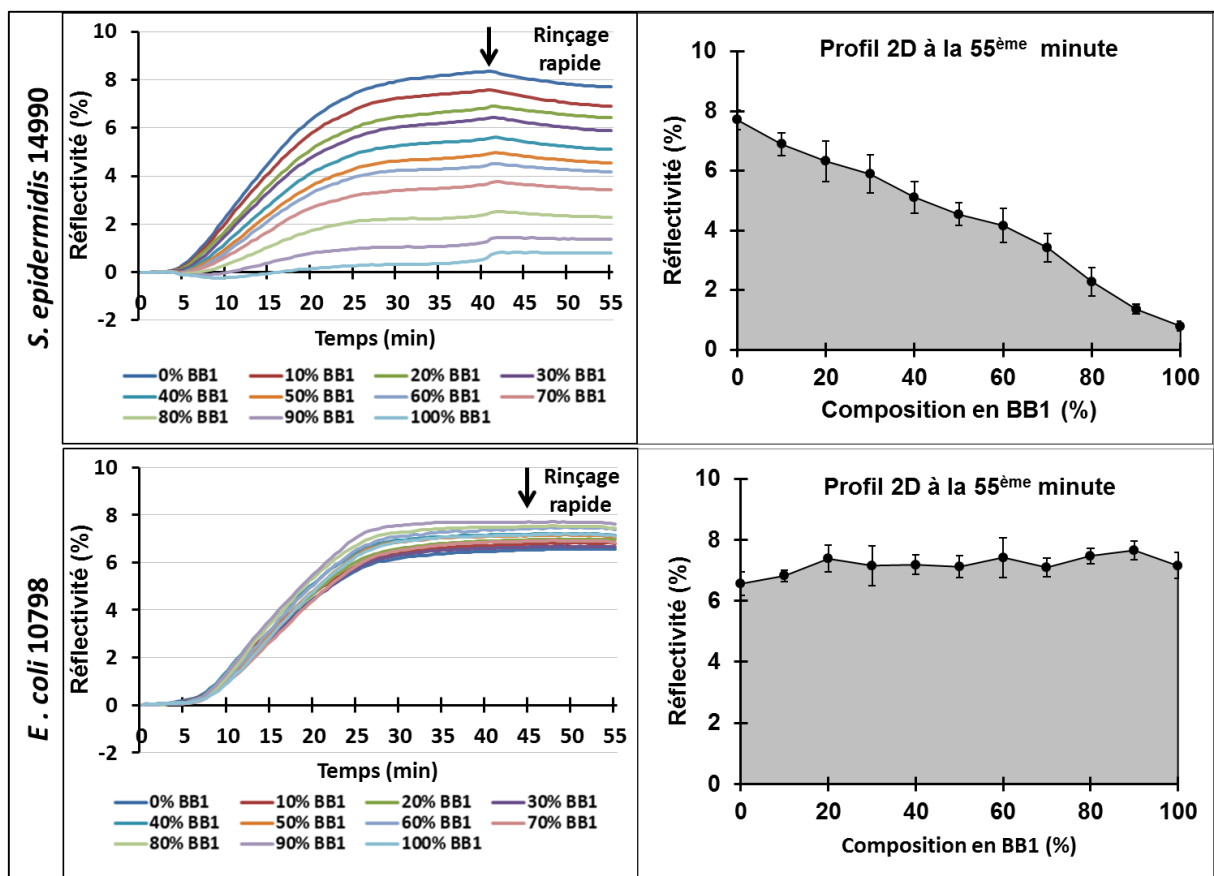


Figure 4-12 : Sensogrammes et profils 2D établis afin de discriminer 2 espèces de bactéries *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*.

La souche de *Staphylococcus epidermidis* pour une concentration moyenne de $1,2 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ montre une meilleure affinité pour les récepteurs riches en lactose sulfate (BB2) et ce de manière proportionnelle au ratio de cette brique de base dans la composition des récepteurs combinatoires. La souche *Escherichia coli* montre quant à elle presque la même affinité pour l'ensemble des récepteurs avec une intensité de réflectivité comprise entre 6 et 8 % (Figure 4-12) pour une concentration moyenne de $1,3 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹.

De plus le mode de représentation par image 3D (Figure 4-13) globalise les informations issues du sensogramme et du profil 2D où les intensités de couleur reflètent les variations d'intensité de signal SP_{Ri}. Ces images continues 3D sont donc propres à chaque souche et permettent de mieux les distinguer visuellement.

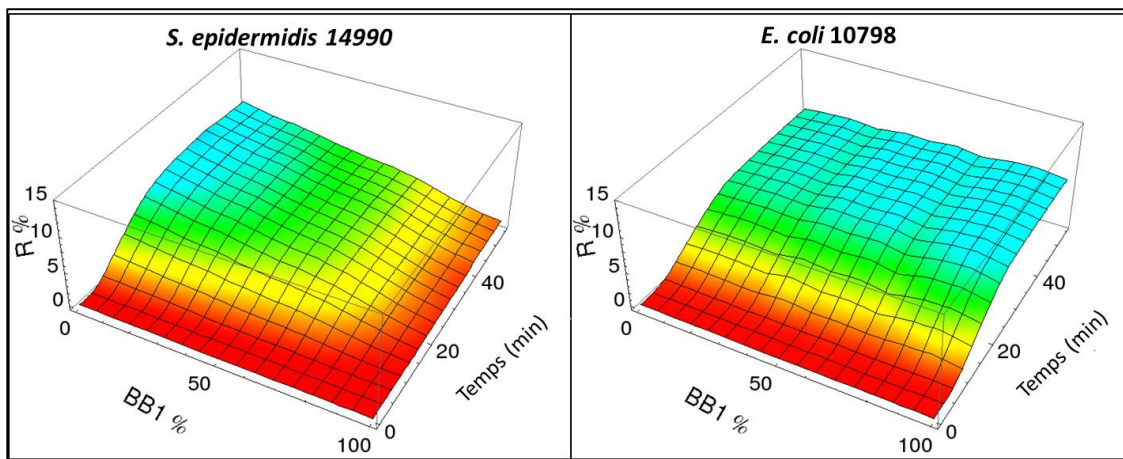


Figure 4-13 : Images 3D correspondant à la souche *S. epidermidis* 11775 et *E. coli* 10798 concentrées respectivement à $1,2 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ et $1,3 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹.

4.5.2 Discrimination entre les souches

Nous avons suite à ces premiers résultats, étudié une seconde souche pour chacune des espèces *S. epidermidis* 12228 et *E. coli* 11775 afin de déterminer la capacité de notre eT à discriminer des souches différentes de la même famille. Nous avons pour cela utilisé des concentrations bactériennes comparables entre les deux souches d'une même espèce.

4.4.2.1 Staphylococcus epidermidis

Lorsque l'on compare les sensogrammes obtenus des deux souches de *Staphylococcus epidermidis*, on remarque qu'elles se distinguent davantage l'une de l'autre lors de la 2^{ème} phase de rinçage avec une dissociation légèrement différente (Figure 4-12 et Figure 4-14). On observe notamment cette dissociation pour les récepteurs composés de 0 à 30% de lactose. Cette variation est aussi visible sur le

profil 2D et sur l'image 3D générés (Figure 4-14). Cependant les intensités de signal sont environ 2 fois moins importantes pour la souche *S. epidermidis* 12228 probablement en raison de la différence de concentration des échantillons analysés ($7,2 \cdot 10^6$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche *S. epidermidis* 12228 et $1,2 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche *S. epidermidis* 14990 déterminées par dénombrement sur milieux gélosés).

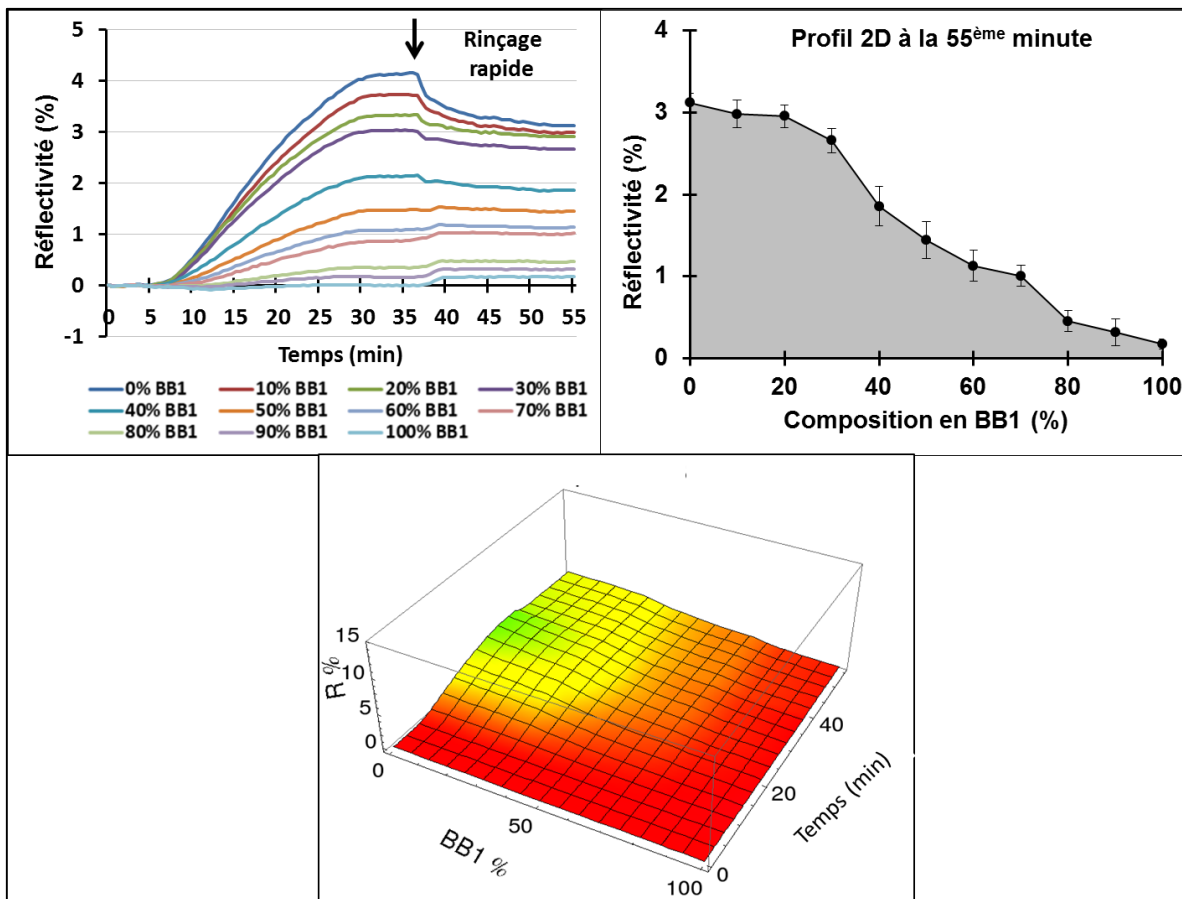


Figure 4-14 : Représentation du sensogramme moyen de la souche *S. epidermidis* 12 228 à une concentration de $7,2 \cdot 10^6$ bactéries.mL⁻¹ et du profil 2D généré à la 55^{ème} minute soit à la fin de la 2^{ème} phase de rinçage. L'image 3D obtenue est considérée comme une empreinte de cette souche bactérienne.

4.4.2.2 *Escherichia coli*

A l'inverse de la souche *E. coli* 10798 (Figure 4-12), la deuxième souche *E. coli* 11775 présente une dissociation importante lorsque le débit de rinçage est augmenté (Figure 4-15). A la 55^{ème} minute, l'intensité de signal de l'ensemble des récepteurs est stabilisée à environ 1%, à l'exception du récepteur composé uniquement de lactose dont le signal est environ de 2,5%. Il reste donc peu de matière à la surface de notre système. On observe également que les cinétiques de dissociation durant cette seconde phase de rinçage dépendent des récepteurs combinatoires étudiés.

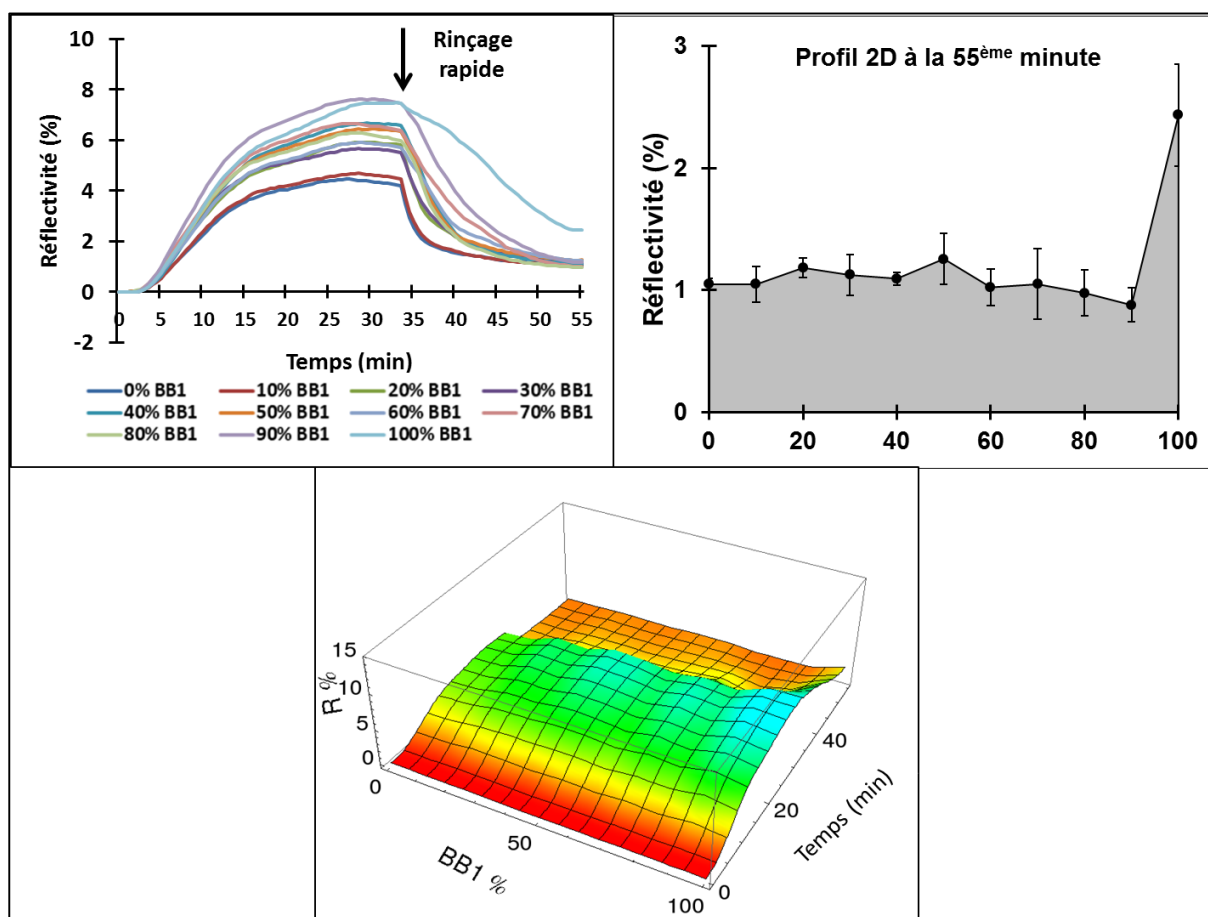


Figure 4-15 : Représentation du sensogramme de la souche *E. coli* 11775 ainsi que du profil 2D généré à la 55^{ème} minute soit à la fin de la 2^{ème} phase de rinçage. L'image 3D obtenue est considérée comme une empreinte de cette souche bactérienne.

En conséquence les variations cinétiques observées fournissent des informations supplémentaires pour analyser et discriminer les deux souches *E. coli* 10798 et *E. coli* 11775 car les profils 2D et les images 3D sont très distincts.

L'ensemble des résultats de cette étude prouve que notre système de langue électronique est efficace pour différencier non seulement différents genres et espèces de bactéries mais aussi différentes souches d'une même espèce. Les différences mises en évidence pour chacune des souches peuvent être issues des éléments présents en périphérie des bactéries comme les fimbriae (pili), les microvillosités ou les adhésines. Ces structures protéiques permettent notamment l'attachement des micro-organismes aux cellules de l'organisme hôte grâce à la reconnaissance de motifs glycosylés (glycoprotéines, glycolipides).

4.6 Application de la langue électronique pour l'analyse des bactéries pathogènes

La pathogénicité des bactéries est définie comme étant la capacité d'un micro-organisme à provoquer une maladie tandis que la virulence correspond à la gravité relative de la maladie provoquée par le micro-organisme. Variables en fonction des espèces et des souches, ces deux éléments dépendent également de l'état immunitaire de l'organisme hôte. L'application de notre système de eT pour l'identification et la discrimination de bactéries pathogènes a été réalisée avec :

- Deux souches de *Staphylococcus aureus* à savoir la souche *S. aureus* 25 923 sensible à la méticilline isolée à Seattle en 1945, notée MSSA et la souche *S. aureus* 43 300 résistante à la méticilline et oxalline, notée MRSA.
- Deux souches pathogènes d'*Escherichia coli* entéro-hémorragiques. Elles sont ici définies en fonction de leur sérotype, il s'agit ainsi de la souche *E. coli* O157 et la souche *E. coli* O157 :H7 dont le numéro de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) est le 105917.
- D'une souche de *Salmonella enteritica* de sérotype Typhimurium, dont le numéro de référence est CIP 104515.

L'ensemble de ces souches a été étudié selon la même procédure d'analyse que les souches non pathogènes décrite précédemment, tout en respectant les conditions de sécurité requises pour ces types de pathogènes.

4.6.1 Etude des différentes souches pathogènes

L'ensemble des sensogrammes et profils 2D de toutes les bactéries pathogènes analysées est présenté dans la Figure 4-16 et son image 3D dans la Figure 4-17.

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* identifiées par les numéros ATCC 43300 et 25923 présentent une résistance différente pour la méticilline. Leurs analyses montrent pour toutes les deux une meilleure affinité pour les récepteurs riches en lactose-sulfate (Figure 4-16). Lors de l'augmentation du débit de la seconde phase de rinçage, il n'y a pas de variation significative du signal mesuré. Les profils 2D présentés ici, sont des signaux moyens issus de 5 analyses différentes de ces souches sur deux prismes différents (3 analyses pour le 1^{er} prisme et 2 analyses sur le second). Les concentrations moyennes utilisées sont de $1,2 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche résistante à la méticilline (MRSA) et de $8,6 \cdot 10^6$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche sensible à l'antibiotique (MSSA) après dénombrement sur milieu gélosé TSA. On remarque également que l'allure du profil 2D de la souche MSSA ressemble au profil établi pour la souche *S. epidermidis* 12228 (Figure 4-14). Toutefois ces deux espèces se distinguent par leurs cinétiques de dissociation bactéries-récepteurs bien différentes d'où l'importance de considérer les informations cinétiques de notre système de langue électronique. Cependant les images 3D générées pour les souches MRSA et MSSA ne permettent pas de se discriminer clairement.

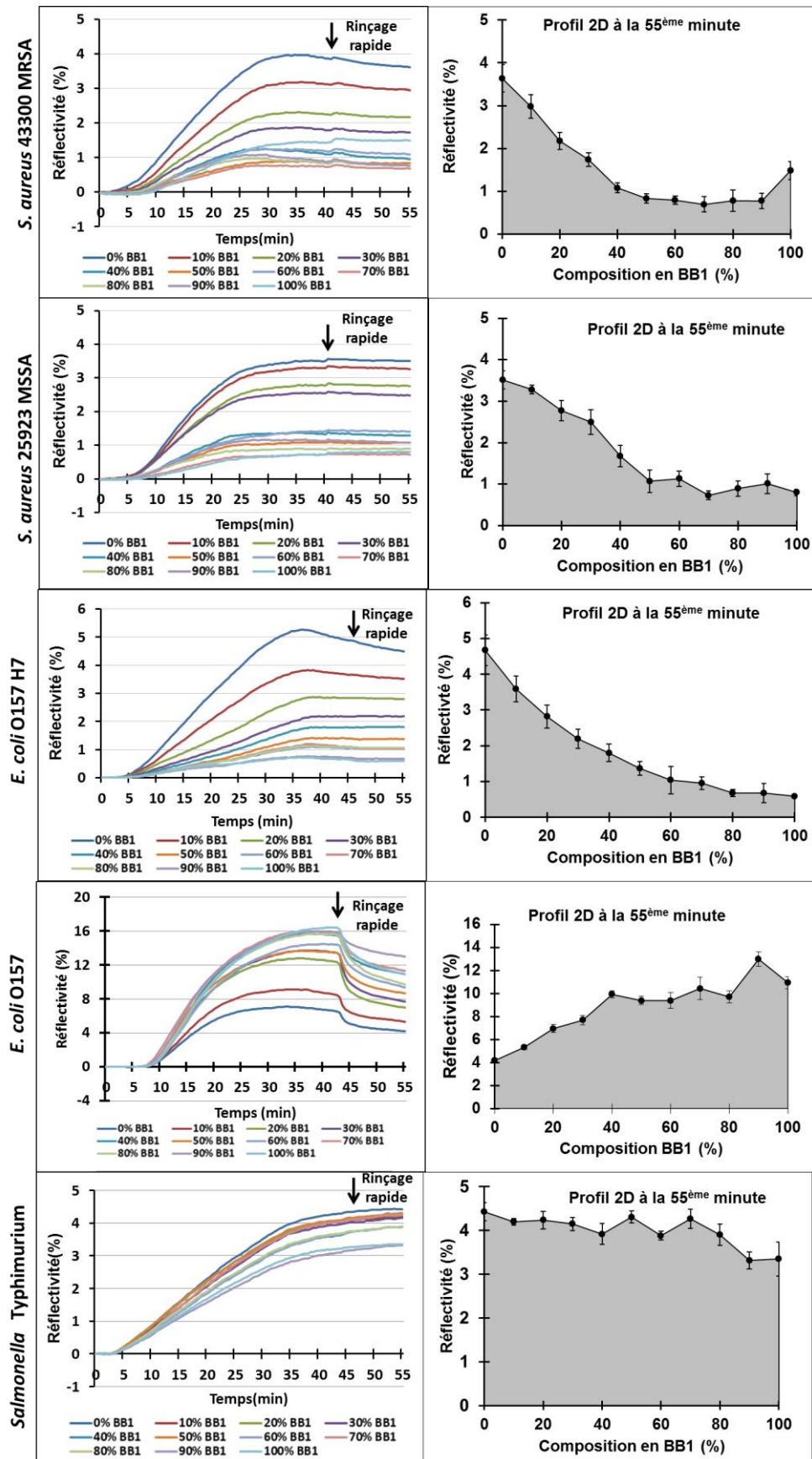


Figure 4-16: Sensogammes et profils 2D générés pour des bactéries pathogènes du genre *Escherichia*, *Staphylococcus* et *Salmonella*.

Lors de l'étude des deux souches pathogènes d'*Escherichia coli* (O157:H7 et O157), on observe en premier lieu la souche *E. coli* O157:H7 par sa très forte affinité pour les récepteurs riches en lactose sulfate à l'inverse des autres souches de cette espèce qui présentent le moins d'affinité pour ces récepteurs. Nous pourrions émettre l'hypothèse que l'affinité de la souche *E. coli* O157:H7 pour les récepteurs riches en lactose serait issue de l'antigène H7 présent sur les flagelles. Cependant la souche *E. coli* 11775 étudiée précédemment, possède également cet antigène à sa surface mais ne montre pas du tout les mêmes affinités pour les récepteurs, ce qui réfute l'hypothèse de reconnaissance de l'antigène H7.

En second lieu l'augmentation du débit de rinçage montre peu d'effets pour la souche *E. coli* O157:H7 tandis que pour la souche *E. coli* O157, cette modification de débit génère une dissociation nettement visible sur le sensogramme et sur l'image 3D associés à cette souche. La différence d'intensité de signal observée résulte en partie de la concentration moyenne des échantillons analysés évaluée à $9,7.10^6$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche *E. coli* O157:H7 et à $2,6.10^7$ bactéries.mL⁻¹ pour la souche *E. coli* O157.

L'espèce *Salmonella enteritica* Typhimurium a également été étudiée au cours de ces travaux à une concentration de $2,25.10^6$ bactéries.mL⁻¹ pour introduire l'étude d'un autre genre de bactérie étudié particulièrement dans la sécurité alimentaire. Cette souche montre une signature très différente des autres bactéries analysées.

De plus les images 3D obtenues pour chacune des bactéries se distinguent relativement bien les unes des autres ce qui confirme la capacité de notre eT pour réaliser la discrimination de bactéries pathogènes (Figure 4-17).

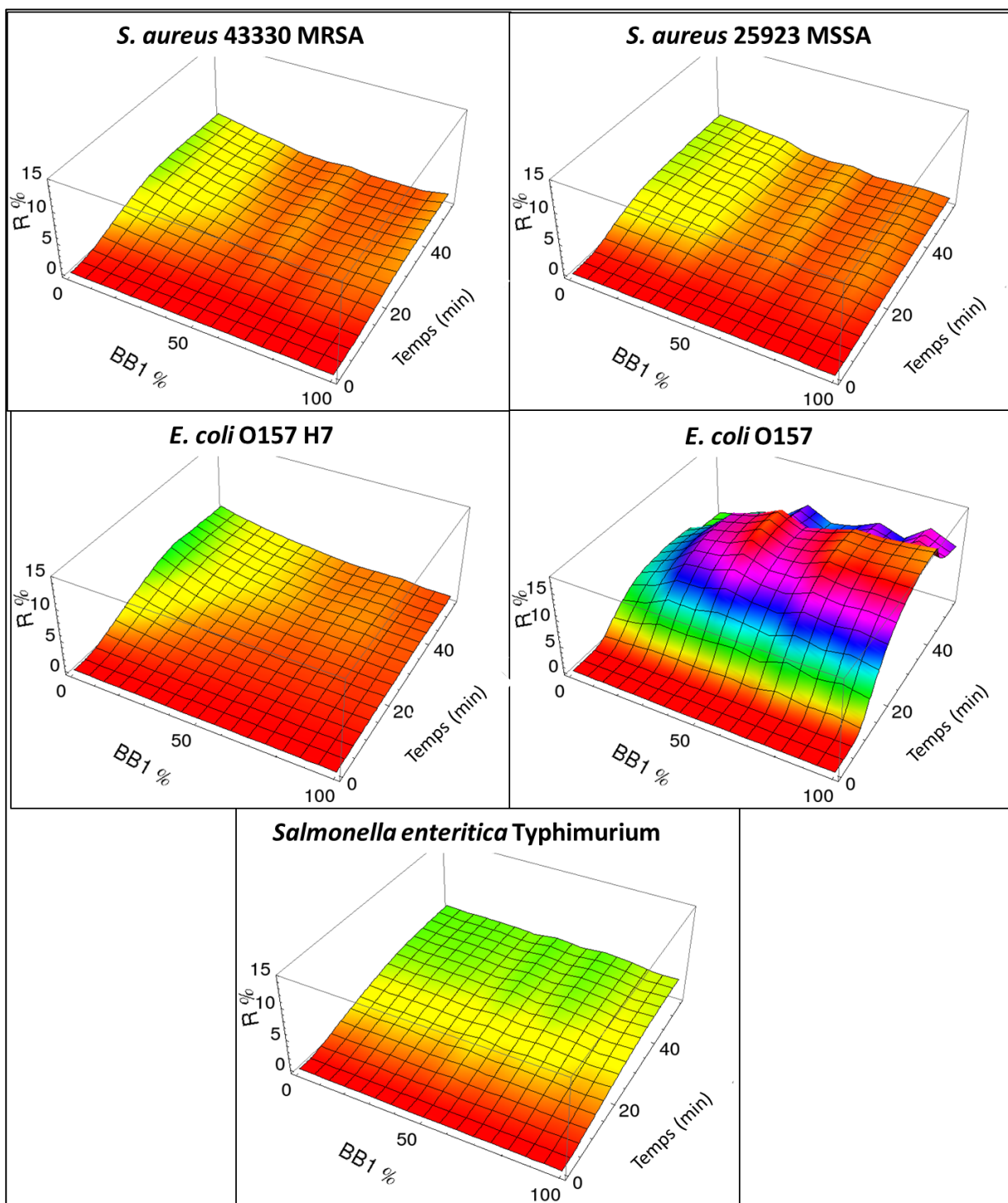


Figure 4-17 : Images 3D des bactéries pathogènes étudiées.

L'ensemble des résultats, des profils 2D et des images 3D montre que notre système est pertinent pour l'analyse de ces bactéries pathogènes.

4.6.2 Classification des bactéries étudiées par PCA

Afin d'évaluer la capacité de notre système à classifier l'ensemble des données sur les bactéries non pathogènes et pathogènes, nous avons réalisé une analyse en composantes principales en utilisant les données des images 3D. Le nombre de variable analysé est ici de 1210 puisque les images 3D ont été générées par les données de réflectivité obtenues pendant les 55 minutes d'analyse avec un intervalle de mesure de 30 secondes. Cette méthode permet de réduire le nombre de données qui sont normalement acquises toutes les 0,1 secondes. De plus deux injections au minimum ont été utilisées pour chacune des souches analysées afin de réaliser cette étude par PCA.

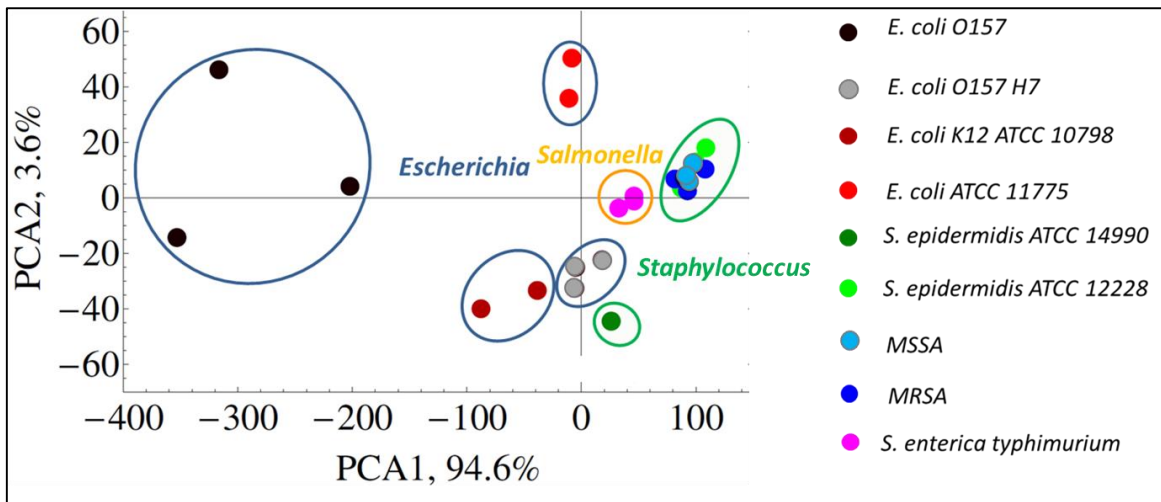


Figure 4-18 : Représentation de l'Analyse en composantes principales réalisée pour l'ensemble des bactéries pathogènes et non pathogènes étudiées

La représentation simplifiée PCA selon deux composantes principales, Figure 4-18, illustre l'analyse de l'ensemble des bactéries où chacun des genres *Escherichia*, *Staphylococcus* et *Salmonella* est distinct l'un de l'autre. La variance globale de la représentation est de 98,2% par rapport aux données d'origine, la perte d'information est donc faible avec 1,8%. On constate que pour l'espèce *E. coli* les différentes souches forment des clusters distincts bien définis dans l'espace. En revanche pour le genre *Staphylococcus*, il est impossible de distinguer clairement les différentes souches étudiées à l'exception de la souche *S. epidermidis* 14990. Nous avons donc réalisé une seconde PCA dédiée à ce genre de bactéries (Figure 4-19).

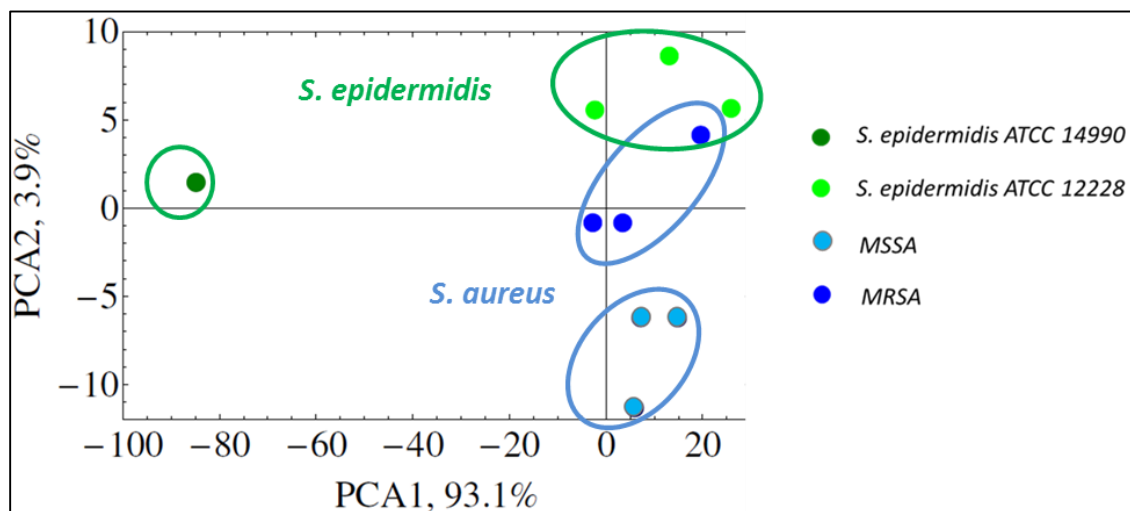


Figure 4-19 : Représentation de l'analyse en composantes principales réalisée avec des souches pathogènes et non pathogènes du genre *Staphylococcus*.

On constate sur cette représentation dédiée au genre *Staphylococcus* qu'il semblerait possible de distinguer et de classer les différentes espèces et souches étudiées. Cependant un plus grand nombre d'analyse serait nécessaire afin de valider cette affirmation.

4.7 Détection des bactéries dans un milieu complexe: le lait

L'analyse de bactéries dans des milieux complexes représente un grand challenge, dans cette partie nous avons réalisé quelques tests préliminaires en utilisant la souche *E. coli* 10798 selon 3 conditions :

- Lors d'une mise en culture dans un milieu de croissance conventionnel de TSB durant une nuit (environ 12h) à 37° C sous agitation
- Lors d'une mise en culture dans du lait demi-écrémé UHT durant une nuit (environ 12h) à 37° C sous agitation.
- Lors d'un mélange juste avant analyse entre la souche *E. coli* 10798 en suspension dans du tampon HEPES (issue de la première condition de croissance) et du lait demi-écrémé UHT conservé à 37°C. La concentration finale en bactéries dans l'échantillon est de 1.10^7 bactéries.mL⁻¹ tandis que la concentration en lait de 0,125% v/v.

Tout d'abord, à titre de comparaison nous avons analysé du lait non contaminé soumis sur une nuit à une température de 4°C (Figure 4-20a) ou à une température de 37°C sous agitation (Figure 4-20b). Comme le montre la Figure 4-20, les deux conditions de conservation ne génèrent pas de différences significatives lors de l'analyse des échantillons sur notre système de langue électronique. Les profils établis pour les deux laits sont relativement similaires.

Lorsque l'on mélange les bactéries avec du lait (Figure 4-20d), juste avant l'analyse on retrouve une combinaison des signaux de chacun des échantillons du lait et de la bactérie (Figure 4-20c). Cependant

le sensogramme et le profil continu 2D obtenus ne correspondent pas à une simple addition des signaux, ce qui peut être le résultat d'un effet de compétition entre le lait et la bactérie *E. coli* 10798 pour la surface du réseau de récepteurs combinatoires. En conséquence l'analyse des bactéries dans un milieu complexe s'avère être très compliquée, notre système de eT n'est pas adapté à ce genre d'étude.

En revanche, la croissance des bactéries dans le lait génère des profils intéressants. On remarque ainsi que l'intensité moyenne du signal pour le récepteur composé uniquement de lactose sulfate est d'environ 2% à la 55^{ème} minute, ce qui est très largement inférieur aux résultats obtenus pour le lait non contaminé. Dans le cadre de cette croissance, on effectue une dilution de l'échantillon à 0,125% (v/v) dans le tampon HEPES avant l'injection afin de pouvoir établir une comparaison par rapport à l'intensité de signal du lait. La concentration de bactérie dans cet échantillon dilué est de $1,3 \cdot 10^5$ bactéries.mL⁻¹. En effet la présence de bactéries en quantité importante, ainsi que la consommation du lactose comme source de carbone ont très probablement entraîné une diminution du signal du lait. Nous pouvons donc dire en raison de ces résultats que le développement des bactéries dans ce milieu composé de lait a modifié les caractéristiques de ce dernier.

Les résultats, Figure 4-20, peuvent également être comparés à ceux obtenus lors de l'étude du vieillissement du lait UHT, plus particulièrement à 48 et 72h de vieillissement. Nous avons établi que le signal était fortement diminué soit par la détérioration naturelle du lait, soit en raison d'une contamination bactérienne (Figure 3-7). Cette étude corrobore ces deux hypothèses au cours de notre étude sur le vieillissement.

Toutefois notre système n'est pas adapté à l'identification de bactéries en milieux complexes. En revanche, l'ensemble de ses résultats fait apparaître qu'il est possible de détecter des anomalies comme la contamination du lait lors de comparaison avec un échantillon de référence (standard) par notre langue électronique. Par la suite un échantillonnage (prélèvement) peut être effectué pour mettre en culture les micro-organismes afin de les isoler et de les identifier. Cette dernière étape peut être soit basée sur l'utilisation de méthodes dites spécifiques, soit sur notre système eT par comparaison de l'image 3D générée avec celles de la bibliothèque créée lors de la phase d'apprentissage.

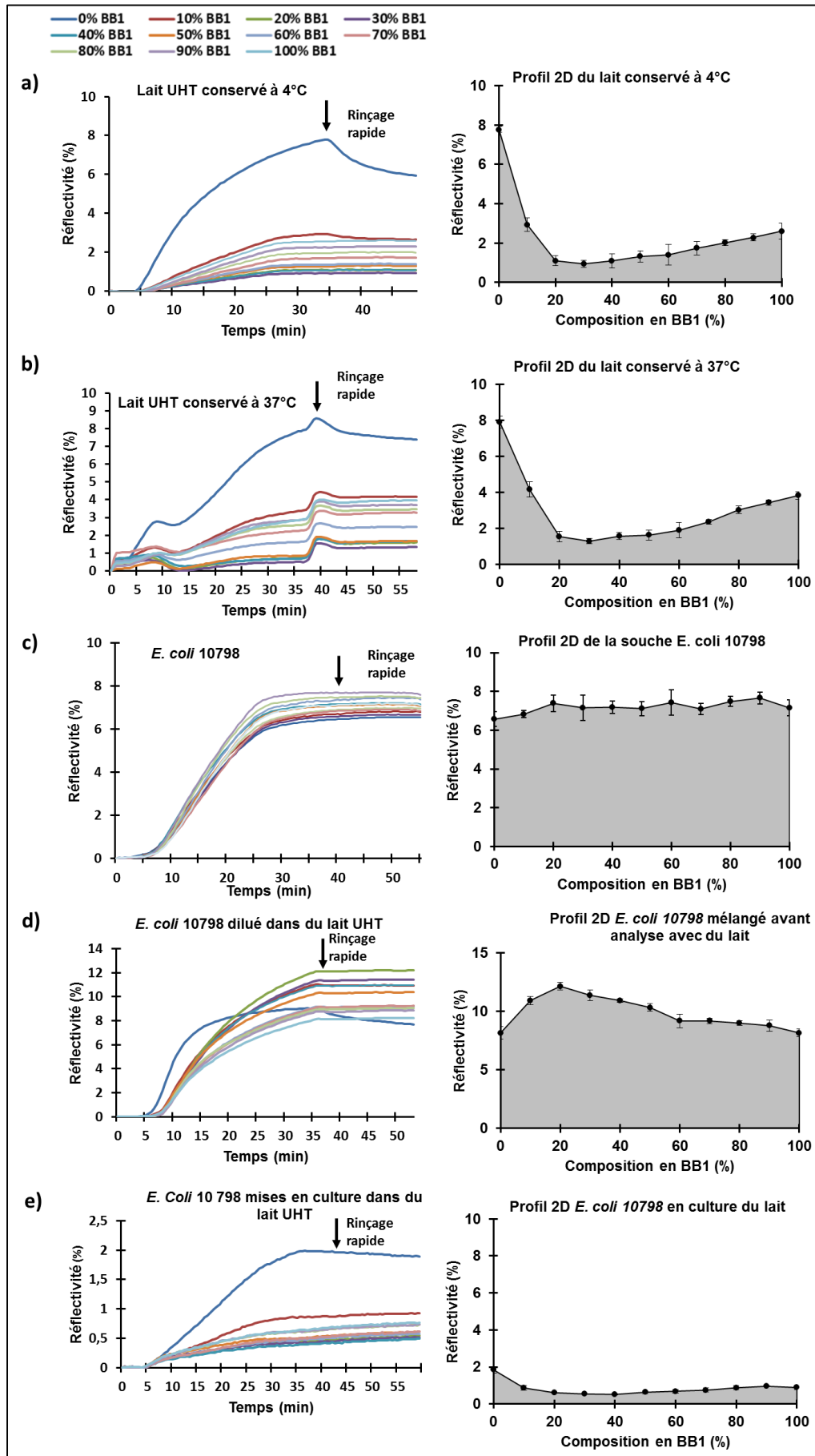


Figure 4-20 : Représentation des sensogrammes et des profils 2D obtenus pour chacune des conditions testées

Remarque : Au cours de l'étude des bactéries nous avons utilisé deux prismes d'or fonctionnalisés le même jour et dans les mêmes conditions. Nous avons remarqué qu'après 15 jours d'utilisation avec un flux continu, ces prismes commencent à présenter des variations de signal sur certains récepteurs abîmés. Cette dégradation progressive des récepteurs combinatoires rend le système totalement inutilisable à 17 jours. La dégradation des prismes utilisés pour les bactéries est donc plus rapide en comparaison de ceux utilisés pour l'analyse des milieux complexes.

Conclusion

L'application de notre système de langue électronique pour une discrimination et une classification des souches pathogènes et non pathogènes est réalisable dans un milieu tampon (HEPES) grâce aux optimisations réalisées sur la partie fluïdique. L'imagerie SPR permet d'acquérir des informations sur la cinétique d'association et de dissociation des bactéries grâce à notre réseau de récepteurs combinatoires à réactivités croisées. Ainsi les premières études montrent la capacité et la performance de notre système de langue électronique à générer des signatures spécifiques (profil continu 2D et image 3D) propres à chaque souche. Les tests réalisés pour l'application du système dans le secteur alimentaire s'avèrent prometteurs pour la détection et éventuellement pour l'identification de contaminations dans les milieux complexes. Il serait toutefois intéressant d'explorer d'avantage les éléments de reconnaissance ainsi que les mécanismes mis en jeu entre le réseau de récepteurs combinatoires et les souches bactérienne étudiées grâce à la biologie moléculaire dans le but de compléter les analyses. Pour cela l'expression et la purification de protéines de surface présentes sur les bactéries pourrait être réalisés afin de les étudier grâce à notre système de langue électronique.

Conclusion générale

La langue électronique (eT) utilisée au cours de ces travaux a été développée dans le but de simplifier la réalisation de matériaux sensibles associés à l'imagerie par résonance de plasmons de surface. Des récepteurs ont été construits grâce au mélange en solution de deux petites molécules en proportions contrôlées et à leur dépôt puis auto-assemblage sur la surface d'un prisme recouvert d'or. Les récepteurs obtenus possèdent des propriétés physicochimiques différentes, ce qui permet de créer un réseau de récepteurs combinatoires à réactivités croisées. Cette approche combinatoire permet d'obtenir rapidement et facilement un très grand nombre de récepteurs en modifiant le ratio des mélanges ou en introduisant de nouvelles briques de bases. Le système de SPRi permet quant à lui d'étudier les interactions cibles-sondes sans marquage et en temps réel.

Les objectifs de cette thèse est d'explorer les applications potentielles d'un système de langue électronique développé récemment au laboratoire pour l'analyse et la discrimination de différents milieux complexes et de bactéries.

L'étude de milieux complexes a été réalisée sur des échantillons de différentes natures comme le vin, la bière et le lait. Cette étude a montré que les récepteurs combinatoires à réactivités croisées sont sensibles et capables de répondre avec une bonne sélectivité aux milieux complexes. De plus, notre système peut générer des profils continus 2D et des images 3D, propres à chaque échantillon. Grâce à ces signatures, nous avons réussi à différencier et classer ces divers types de boissons. Le dispositif a également prouvé son efficacité pour l'analyse de milieux complexes riches en protéines comme les boissons d'origines végétale et animale. Le suivi du vieillissement du lait, illustre quant à lui l'application potentielle de notre système dans le secteur de l'agroalimentaire, notamment pour les contrôles qualités.

La seconde partie de ce travail a été dédiée à l'application du système d'eT pour la détection de bactéries. Dans un premier temps, nous avons particulièrement optimisé les paramètres fluidiques, en raison de la morphologie variable de ces objets biologiques complexes et volumineux. Une cuve hexagonale avec une profondeur de 0,3 mm et un débit fluidique de $0,52 \mu\text{L.s}^{-1}$ fournissent les conditions permettant l'homogénéité de la solution dans la cuve et ainsi l'optimisation des interactions entre le réseau de récepteurs combinatoires et les bactéries. Le système s'est révélé performant pour l'analyse de bactérie dans des gammes de concentrations supérieures à 1.10^6 bactéries.mL⁻¹, ce qui est comparable aux concentrations autres méthodes standards actuellement utilisées. Il est également possible de quantifier ces analyses. Par la suite, la langue électronique a permis la discrimination de différentes bactéries selon leur genre, leur espèce et en fonction des souches grâce aux profils continus 2D et aux images 3D. Pour classer les bactéries pathogènes et non pathogènes étudiées, l'analyse en

composantes principales basée sur les images 3D s'est avérée plus pertinente que celle basée sur les profils continus 2D. En effet, l'utilisation du système SPRi permet à notre langue électronique de fournir des informations supplémentaires sur la cinétique d'interaction, contenues dans les images 3D. Ceci est un progrès par rapport à d'autres systèmes existants.

Les études réalisées dans cette thèse ouvrent des perspectives pour l'utilisation de notre système de langue électronique comme outil de détection des contaminations, par exemple dans le lait, en comparant avec un échantillon standard. Par la suite ce dispositif pourrait proposer une approche complémentaire pour l'identification de micro-organismes après leur mise en culture, ceci par comparaison des images 3D avec celles de la bibliothèque créée lors de la phase d'apprentissage.

Annexes

Annexe 1

A-1 Fabrication et caractérisation de microélectrodes de diamant

Ce chapitre développe les travaux entrepris pour réaliser la fabrication d'un capteur de type langue électronique composé d'un réseau de microélectrodes diamant fonctionnalisées associé à un système de transduction électrochimique. Sa réalisation est issue de la collaboration de l'équipe Semi-Conducteur Grand Gap (SC2G) du laboratoire Institut Néel réalisant l'étude et la croissance du diamant avec le laboratoire Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques (CREAB) rattaché à l'unité mixte de recherche 5819 du SPrAM (Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaire) pour la fonctionnalisation de surface.

Le but de ce travail à l'Institut Néel était de développer un nouveau système de langue électronique basé sur un réseau de microélectrodes de diamant couplé à un système de transduction de type électrochimique. Ce système comme nous l'avons expliqué précédemment n'a pas pu aboutir à un dispositif fonctionnel. Afin d'illustrer le travail réalisé, nous aborderons les applications et les propriétés du diamant avant de décrire les croissances assistées par plasma mises en œuvre sur un substrat de silicium pour réaliser un réseau de microélectrodes diamant (MEA pour Micro Electrode Array). Les MEA étudiées dans ce chapitre ont été réalisées lors de mes premiers mois de mon projet avec l'aide de Clément Hebert du laboratoire SC2G. Elles ont été caractérisées sans fonctionnalisation par microscopie à balayage et par électrochimie. Nous avons également réalisé des études préliminaires de fonctionnalisation de diamant avec de la biotine.

A-1.1 Le diamant

Composé chimiquement d'atomes de carbone, le diamant se forme naturellement depuis des milliards d'années dans le manteau terrestre à une profondeur de plus de 150 km sous des conditions extrêmes de température et de pression, supérieures à 1500°C et à 5 GPa [192]. Ce matériau se distingue par ses liaisons covalentes de type sp^3 mises en jeu pour former une structure cristalline tridimensionnelle cubique à faces centrées comme le montre la Figure A1-1.

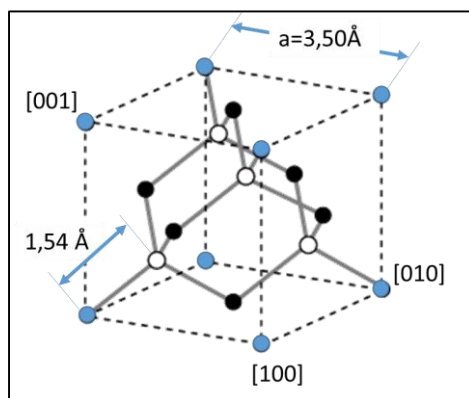


Figure A1-1 : Schématisation de la maille élémentaire cristallographique du diamant de 3,50 Å de côté. La distance interatomique est de 1,54 Å [193].

Cette structure cristalline fait du diamant, un matériau rigide et dense avec $1,76.10^{23}$ atomes. cm^{-3} . Elle offre aussi à ce minéral de nombreuses propriétés mécaniques, thermiques, optiques, chimiques et électriques qui rendent le diamant applicable dans de nombreux domaines.

A-1.1.1 Applications et propriétés du diamant

A-1.1.1.1. Propriétés générales du diamant

Les propriétés optiques quant à elles permettent de décrire les 4 grands types de diamants comme le montre le Tableau A1-0-1 ci-dessous.

Tableau A1-0-1 : Classification des différents types de diamants en fonction du taux d'azote et des caractéristiques des impuretés.

Types	Compositions et caractéristiques	Couleurs	Particularités
I a	Petits groupes d'azote Contient 0,3 % d'azote	Incolore, jaune pâle	Type majoritaire des diamants naturels Fluorescence bleue Raies d'absorption étroites en infrarouge
I b	Azote isolé Contient 0,1 % d'azote	Jaune intense au brun	Type majoritaire des diamants synthétiques Raies d'absorption larges en infrarouge
II a	Pur sans azote	Incolore, blanc exceptionnel	Transparent aux UV < 230 μm Electriquement isolant
II b	Sans azote avec 0,1 % de bore	Bleue	Semi-conducteur de type p

La propriété mécanique peut être représentée à titre d'exemple par sa dureté de 10 sur l'échelle de Mohs (évaluée de 1 à 10) ce qui fait du diamant le matériau le plus dur, mais il est également très résistant au choc en raison de sa capacité de déformation élastique [194]. Son faible taux d'usure et sa forte

résistance au choc permettent l'utilisation du diamant notamment pour des outils de découpe, d'abrasion ou de polissage soit par inclusion (incorporation) du diamant soit par dépôt d'une fine couche afin de former un revêtement de diamant synthétique [195]. D'autres propriétés du diamant et des applications sont décrites dans le Tableau A1-0-2, ci-dessous :

Tableau A1-0-2 : Principales propriétés et applications du diamant [194]

Propriété	Valeur	Applications
Dureté (GPa)	80-110	Abrasifs, outils de coupe.
Module d'Young (GPa)	1100	
Module de cisaillement (GPa)	550	
Module de compressibilité (GPa)	440	
Coefficient de Poisson	0.07	
Coefficient de friction	0,05-0,15	Dissipateurs thermiques
Conductivité thermique ($\text{W.cm}^{-1}.\text{K}^{-1}$)	25 à 300 K	
Coefficient de dilatation thermique	1×10^{-6} à 300 K	Fenêtres optiques
Indice de réfraction	2,41 à 590 nm	
Transmission	225 nm – IR lointain	Fonctionnement en environnement chimique agressif ou radiatif
Réactivité chimique	Inerte < 600°C	
Bande interdite (eV)	5,45 (indirecte)	Electronique haute fréquence/puissance Fonctionnement à haute température
Mobilité des électrons ($\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	2200	
Mobilité des trous ($\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	2000	Dispositifs à émission de champ
Vitesse de saturation (cm.s^{-1}) (pour 10^4 V.cm^{-1})	électrons : $2,7 \times 10^7$ trous : $1,1 \times 10^7$	
Champ de claquage (V.cm^{-1})	1×10^7	
Constante diélectrique	5,5	
Résistivité électrique ($\Omega.\text{cm}$)	10^{15} - 10^{16}	
Affinité électronique	Faible, voir négative	
Vitesse du son m.s^{-1}	18200	

Nous pouvons également citer la conductivité thermique du diamant, 5 fois plus élevée que celle du cuivre, ce qui en fait un meilleur conducteur thermique [196]. Sa faible capacité calorifique (capacité à conserver la chaleur) et son faible coefficient de dilatation thermique font du diamant un excellent matériau pour dissiper la chaleur. C'est pourquoi il est notamment utilisé comme dissipateur thermique dans l'électronique à forte densité de composants.

La biocompatibilité du diamant est issue de son inertie chimique [197, 198] qui le rend utilisable comme support [199, 200] ou comme interface cellulaire [201] dans le domaine médical pour la prolifération de cellules [202-204]. Il est également utilisé dans la conception de rétines artificielles [205] ou pour le revêtement de prothèses par exemple.

Semi-conducteur à large bande interdite, le diamant dans sa forme non dopée, dite diamant intrinsèque, conserve son rôle d'isolant dans une large gamme de température, tandis que son champ de claquage

élevé lui permet de résister à de hautes tensions [206] [207]. Cependant ses propriétés peuvent être modulées par l'incorporation (dopage) d'autres atomes dans sa structure cristalline. Il a été montré que lorsque le diamant est dopé avec des atomes de bore, il peut devenir un semi-conducteur de type p [208], voire même un conducteur métallique pour des dopages très importants au bore [209]. Cette caractéristique particulière conjuguée à sa conductivité thermique rend le diamant d'autant plus intéressant ; comme composant électronique de type transistors à effet de champ [210], comme diode Schottky [211], mais aussi pour les applications de radiofréquence de puissance [212] ou encore comme électrode électrochimique [213].

A-1.1.1.2. Application particulière en électrochimie

L'application en l'électrochimie du diamant est notamment réalisable par sa grande inertie chimique qui rend le diamant résistant aux traitements acides, basiques et oxydatifs, ce qui permet son utilisation dans des domaines biologiques ou chimiques très variés [214]. De plus les électrodes dopées au bore dites BDD (Boron Doped Diamond) possèdent une large fenêtre de potentiels en milieux aqueux en comparaison à d'autres matériaux tels que l'or, le platine ou le graphite ; ainsi qu'un très faible courant de fond, environ 10 fois moins important que les électrodes métalliques [215] comme le montre la Figure A1-2.

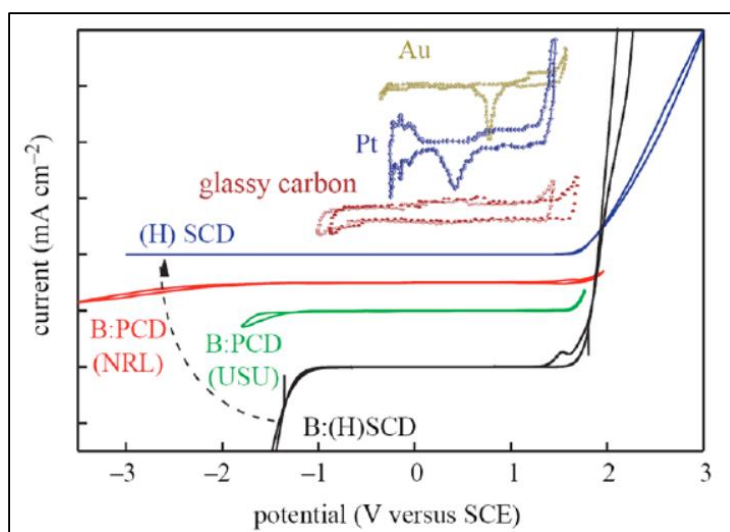


Figure A1-2 : Les voltampérogrammes décrivent l'évolution de la fenêtre de potentiels de différents types d'électrodes diamant dopé au bore et de type métallique (or, platine, carbone vitreux). En bleu : film monocristallin intrinsèque hydrogéné. En rouge : film poly-cristallin dopé (c'est-à-dire composé de plusieurs cristaux), $[B] = 5.10^{19} \text{ B.cm}^{-3}$. En vert : film poly-cristallin dopé, $[B] = 5.10^{20} \text{ B.cm}^{-3}$ et en noir : film monocristallin dopé, $[B] = 3.10^{20} \text{ B.cm}^{-3}$ [216].

Le diamant constitue donc un matériau de choix dans le domaine de l'électrochimie pour des applications de diagnostic [216-219] et des procédés de dépollution [220-222]. Le diamant possède aussi une très faible capacité de double couche [214]. La mesure de courants d'oxydation ou de réduction par les électrodes constituées de BDD présente une meilleure sensibilité puisque le rapport courant faradique sur courant capacitif est amélioré par le faible courant résiduel des électrodes BDD [223]. De plus la

forte densité du diamant diminue sa sensibilité à l'adsorption d'espèces à sa surface, à l'exception de celle de type organique. En effet le diamant, en particulier dans son état hydrogéné, est peu sujet à l'encrassement par des produits réactionnels ou par des molécules présentes dans le milieu environnant [224]. Les électrodes conservent donc plus longtemps leurs caractéristiques ; c'est la propriété d'anti « fouling ». Lors d'oxydations des surfaces de diamant, il est possible de les régénérer en réalisant une oxydation poussée afin de dégrader les espèces adsorbées à la surface [222]. C'est notamment cette caractéristique qui permet de réaliser la dépollution des eaux par l'oxydation de polluants organiques [221] ou la réduction de composés inorganiques tels que les nitrates [220] sans entraîner de dégradation ou de passivation de l'électrode BDD.

Toutefois la rareté, la taille, la qualité, la composition, les propriétés caractéristiques du diamant ainsi que son coût limitent son application notamment dans le secteur industriel. C'est pourquoi des recherches ont été menées afin de développer des diamants synthétiques reproductibles pouvant répondre aux besoins de l'industrie et pouvant exploiter au mieux le potentiel du diamant en électronique en maîtrisant l'incorporation d'impuretés dopantes lors de sa croissance. Deux méthodes de synthèse du diamant ont été développées au cours du siècle dernier : la synthèse dite HPHT (Haute Pression, Haute Température) et la synthèse par CVD (Chemical Vapour Deposition).

A-1.1.1 Fabrication du diamant par voie synthétique

A-1.1.2.1 Le diamant issu de Haute Pression et Haute Température

Dans cette première méthode, le graphite, est converti en diamant sous haute pression et haute température, conditions où il est stable thermodynamiquement en simulant les conditions naturelles de formation du diamant. Brevetée en 1955 par la société américaine General Electric, cette approche se base sur de forts apports énergétiques ainsi que sur le diagramme de phase du carbone établi par Bundy [225], présenté dans la Figure A1-3, afin d'obtenir un monocristallin dense.

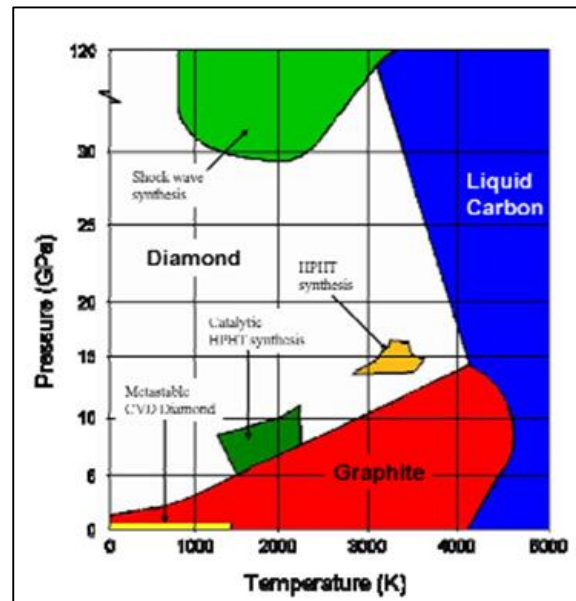


Figure A1-3 : Diagramme de phase du carbone [226]

Ce procédé de croissance HPHT est à l'heure actuelle la méthode de fabrication industrielle la plus utilisée malgré son coût élevé. Toutefois il présente en général une forte contamination à l'azote ce qui ne permet pas l'utilisation de ces diamants synthétisés dans les domaines de l'électronique et de l'optique. Une autre technique a donc été développée afin de diminuer les coûts de synthèse, d'augmenter la taille des cristaux et de contrôler l'incorporation des impuretés lors de la croissance.

4.7.1.1.1 Le diamant synthétique par dépôt chimique en phase vapeur

La seconde méthode alternative à la croissance par HPHT, consiste à synthétiser des films de diamant poly-cristallins par le procédé de dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition (CVD)) à des températures basses comprises entre 700 et 900°C et des pressions inférieures à la pression atmosphérique, de l'ordre de 10 à 100 torr (soit de d'environ 13 à 133mbar) [227, 228], représentées par une zone de couleur jaune sur le diagramme de phase du carbone (Figure A1-4). Sous ces conditions particulières, le substrat utilisé comme support dans ce procédé, doit avoir une bonne stabilité thermique et chimique afin d'assurer l'adhésion du diamant tout au long de la synthèse (température de fusion élevée, coefficient d'expansion faible, absence de réaction non souhaitée) [229]. Deux croissances se distinguent en fonction du substrat utilisé ; l'homo-épitaxie d'une part, lorsque le substrat est de type diamant et l'hétéro-épitaxie d'autre part, pour les croissances sur des substrats non-diamant comme le platine [230] le silicium [231], l'iridium [232] et le tungstène [233].

Le procédé de CVD est réalisé dans une chambre réactionnelle sous vide. Cette dernière est alimentée par une phase gazeuse constituée le plus souvent de dihydrogène, gaz porteur majoritairement présent dans le réacteur et de méthane fournissant le carbone nécessaire à la croissance du diamant. Afin

d'effectuer la croissance du diamant, il est nécessaire d'activer le système par une source d'énergie extérieure de manière thermique avec un filament chaud, ou grâce à un plasma généré par radiofréquence ou par micro-ondes [234] comme l'illustre la Figure A1-4. L'hydrogène et le méthane sont alors décomposés en espèces chimiques réactives de type radicalaires [235] qui peuvent réagir avec les phases cristallines pour s'hybrider aussi bien en sp^2 qu'en sp^3 , respectivement phases graphitique et diamant. Cependant l'hydrogène, réagit de manière préférentielle pour graver les phases non-diamant formées (sp^2) [236, 237] et ainsi permettre la croissance du diamant [229] [238].

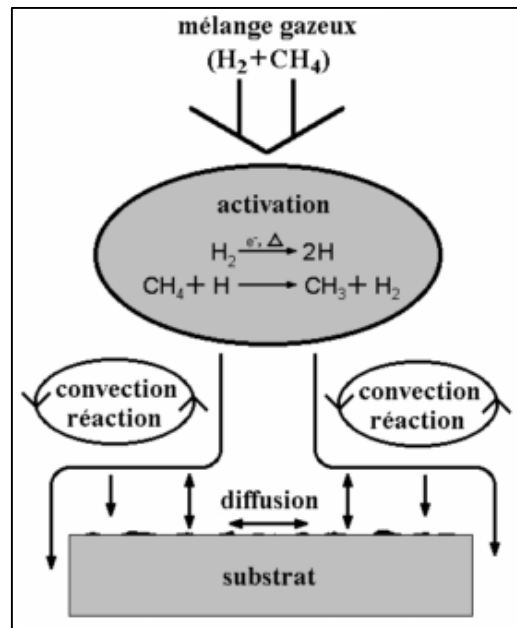


Figure A1-4 : Schéma de étapes et des processus ayant lieu durant le dépôt de diamant par CVD[194]

Dans le cas d'un mélange d'hydrogène et de méthane, la méthode de CVD permet donc d'obtenir un diamant isolant du point de vue électrique. Mais un diamant avec d'autres propriétés peut également être synthétisé en effectuant un dopage chimique lors de la croissance.

Synthèse diamant dopé DD

Deux types de dopage se distinguent en fonction des atomes incorporés dans le maillage de manière spécifique et contrôlée. Le dopage de type n incorpore des donneurs d'électrons comme le phosphore ou l'azote et donne une couleur jaune au diamant tandis que le dopage de type p incorpore des atomes de bore donnant une couleur bleue au cristal. Le dopage de type p, par l'atome de bore est réalisé de manière plus simple et reproductible. Il s'insère par substitution dans la maille diamant grâce à son rayon de Bohr de 0,88 Å proche de celui du carbone de 0,77 Å. Les atomes de bore utilisés pour le dopage de nos échantillons sont issus de diborane gazeux (B_2H_6) ajouté à la phase gazeuse de méthane et d'hydrogène. Les atomes de bore peuvent également être fournis par du tri-méthyle borane. Pour des dopages de 10^{16} à $3 \cdot 10^{20}$ atomes. cm^{-3} de bore, le diamant obtenu présente des propriétés de semi-conducteur, au-delà et jusqu'à $1,5 \cdot 10^{22}$ atomes/ cm^{-3} le diamant possède un caractère métallique [239].

Les conditions de température et de pression mises en jeu dans le procédé de croissance par CVD sont essentielles à maîtriser, tout comme la proportion et la composition du mélange gazeux [240-242]. Par exemple le rapport CH_4/H_2 détermine les vitesses de croissance du diamant : plus ce rapport est important, plus les vitesses de croissance sont importantes [243]. Cependant lorsque ce rapport est trop élevé, la quantité d'hydrogène disponible n'est pas suffisante pour réagir avec l'ensemble des phases non-diamant formées, la qualité du diamant est donc diminuée [234]. Ainsi le rapport gazeux, sa composition, la température de croissance et la pression totale permettent de contrôler les vitesses de réactions et par conséquent les caractéristiques globales des films telles que la morphologie (taille de grains, épaisseur), la pureté de la phase diamant, la rugosité superficielle afin d'élaborer des films diamant adaptés à l'application souhaitée [238]. Les supports non-diamant doivent posséder à leurs surfaces plusieurs sites de nucléation ou germes afin d'améliorer l'accroche et la croissance du diamant en films poly- cristallins.

Durant les premiers instants du dépôt, toutes les faces des germes croissent, puis les cristaux coalescent entre eux et forment un réseau avec des joints de grains, d'où le terme de films poly-cristallins. Cette croissance décrite par le modèle de Van der Drift, présente une croissance verticale des cristaux après le phénomène de coalescence [244]. Seuls les diamants développant une croissance rapide subsistent à la fin de la croissance, les autres cristaux de vitesse inférieure étant englobés comme le montre la Figure A1-5. L'épaisseur est alors de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à plusieurs microns, tout comme la taille des grains qui composent le diamant synthétisé.

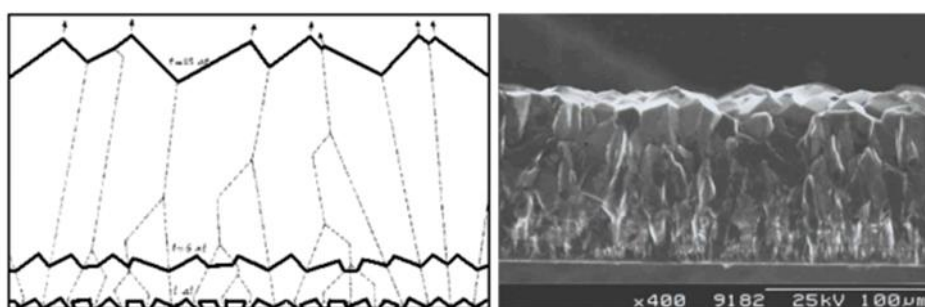


Figure A1-5 : Correspondant image de diamant tranché avec morphologie des cristaux [194].

Le mode de synthèse par CVD a été le seul mode de croissance utilisé au cours de la fabrication du réseau de microélectrodes diamants que nous allons décrire à présent.

A-1.2 Fabrication du réseau de microélectrodes diamant

La fabrication du réseau de microélectrodes (MEA pour « Micro electrode array ») se compose principalement de deux étapes de croissance, d'une étape de gravure et d'une nouvelle étape de croissance. L'ensemble des étapes est représenté dans la Figure A1-6.

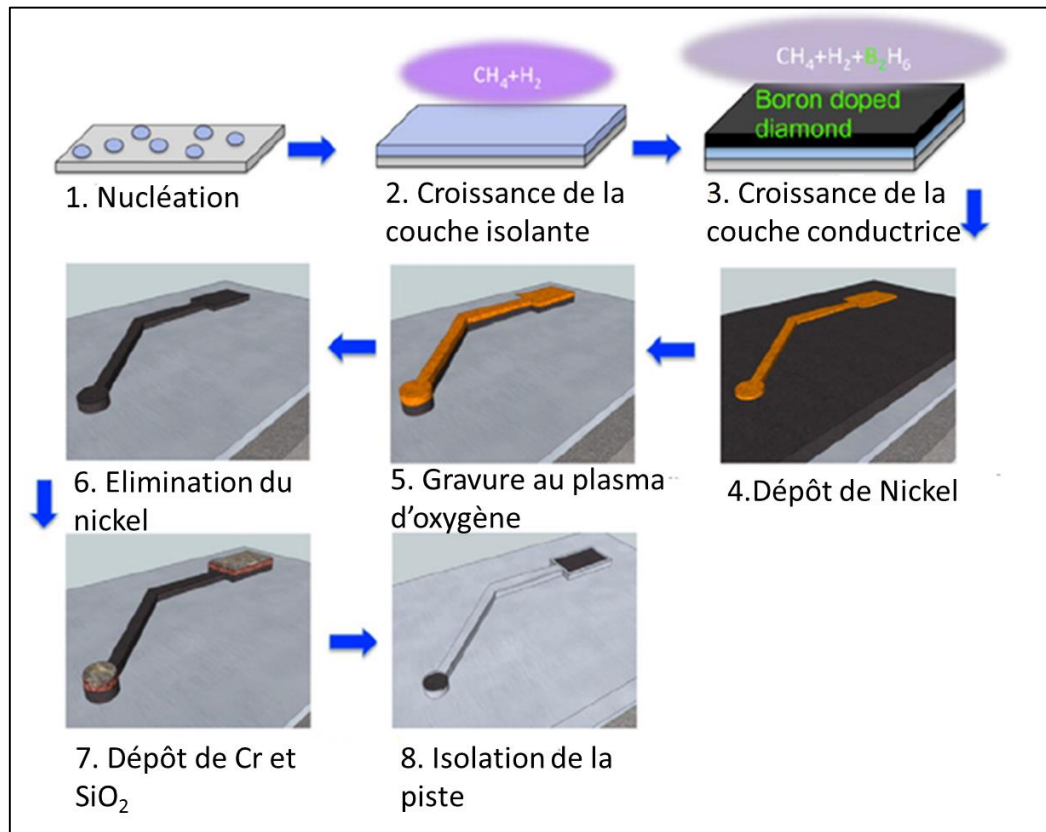


Figure A1-6 : Représentation des 8 étapes principales de fabrication de la matrice de microélectrodes [245].

A-1.2.1 Croissance de diamant intrinsèque puis de diamant dopé au bore

La première étape de fabrication consiste à faire croître du diamant intrinsèque (non dopé) sur un substrat de silicium d'une épaisseur de $1\mu\text{m}$. Cette croissance réalisée dans un bâti de croissance de type SEKI se base sur la technique de dépôt chimique par phase vapeur assistée par plasma microonde, dite MPCVD (Microwave Plasma Chemical Vapor Deposition). Afin d'améliorer le début de croissance par hétéro-épitaxie, des germes (nuclei) de diamant doivent être présents à la surface du silicium c'est pourquoi un champ électrique est appliqué sur le substrat afin d'obtenir une nucléation principale (Bias Enhanced Nucleation ou BEN). Suite à cette étape de nucléation, la croissance du diamant est ensuite réalisée selon les conditions décrites dans le Tableau A1-0-3.

Tableau A1-0-3 : Récapitulatif des conditions de température (T), de pression (P), de la polarisation (BAIS) et de mélange gazeux d'hydrogène (H) et de méthane (C) pour la croissance du diamant intrinsèque dans le bâti SEKI sous une puissance de 1000W.

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 3min ;
Nucléation par BEN	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 10min C/H= 5% BAIS= -260 V
	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 2min C/H= 5% BAIS= -400 V
	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 10min C/H= 5% BAIS= -260 V
Croissance de diamant intrinsèque	T=700 °C ; P= 30 torr ; t= 90min C/H= 1% BAIS= 0 V

La seconde étape, également de croissance, est réalisée dans le bâti mis au point dans le laboratoire du SC2G à partir d'un modèle japonais du « National Institute for Research in Inorganic Materials » (NIRIM), afin d'obtenir du diamant dopé au bore (BDD) d'une épaisseur de 1µm environ. Comme précédemment cette technique se base sur la technique de MPCVD et sur l'utilisation d'un mélange gazeux hydrogène, de méthane et de diborane (source des atomes de bore), ces gaz sont respectivement définis par la lettre H, C et B. Les conditions de croissance décrites dans le Tableau A1-0-4, permettent d'obtenir une concentration en bore estimée à 2.10^{21} atm.cm⁻³ par spectrométrie Raman à 635nm [245].

Tableau A1-0-4 : Récapitulatif des conditions de température (T), de pression (P) et de mélange gazeux d'hydrogène (H), de méthane (C) et de diborane (B) pour la croissance du diamant dopé au bore dans le bâti NIRIM sous une puissance de 270W [246]. Les lettres C, H et B représente respectivement les gaz de méthane, de dihydrogène et de bore

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T= 700°C ; P= 30 torr ; t= 30 min
Croissance du diamant	T= 890°C ; P= 30 torr ; t= 180 min ; C/H 0,5% ; B/C= 6000 ppm

A-1.2.2 Procédé de gravure du diamant par ICP (Inductive Coupled Plasma) d'oxygène

La troisième étape représente la gravure du diamant afin d'obtenir les trames du réseau conducteur des microélectrodes (contacts - pistes - microélectrodes). Elle nécessite en premier lieu, de réaliser les masques de gravure afin de protéger les zones du diamant ne devant pas être gravés. Afin d'effectuer cette protection, une résine photosensible positive est déposée sur la totalité de la surface du diamant puis elle est insolée par lithographie laser pour définir la position des matrices de microélectrodes devant être protégée par un dépôt de nickel. Cette lithographie sans contact est réalisée par le laser DWL66FS fabriqué par Heidelberg. Une épaisseur de 80nm de nickel est déposée sur la surface par évaporation métallique. L'ensemble est alors plongé dans un bain d'acétone afin d'éliminer la couche de résine-nickel et de révéler la matrice des microélectrodes. En effet seuls subsistent les dépôts de nickel directement en contact avec le diamant, ce qui permet de protéger de la gravure la matrice de microélectrodes, les contre-électrodes et les zones de contact (Figure A1-6).

L'étape proprement dite de gravure ICP (Inductive Coupled Plasma) est ensuite réalisée avec un plasma d'oxygène à basse tension (afin de ne pas dégrader trop rapidement le masque de nickel). Le diamant dopé non protégé par le masque de nickel est dégradé jusqu'à révéler la couche de diamant isolant. Afin d'assurer l'isolation des microélectrodes, la gravure est réalisée jusqu'à diminuer de moitié l'épaisseur de diamant intrinsèque. Le masque protecteur de nickel est ensuite éliminé par de l'eau régale chauffée à 190°C (3 volumes d'acide chlorhydrique pour 1 volume d'acide nitrique). Le réseau de microélectrodes obtenu est illustré dans la Figure A1-7, ci-dessous.

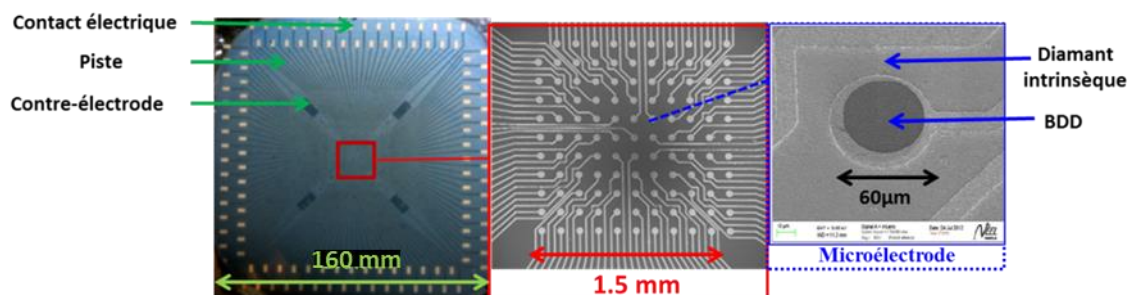


Figure A1-7 : Photographie du réseau de 121 microélectrodes diamant réalisées sur un substrat de silicium ainsi que les 121 contacts électriques associés et les 4 contre électrodes contenus sur une surface total de 2,56cm²

A-1.2.3 Procédé de croissance sélective de diamant non dopé

La dernière étape de croissance sélective de diamant sur les pistes est réalisée pour isoler les connexions des microélectrodes. Une couche de dioxyde de silicium 1,8 μm puis une couche de chrome de 200 nm sont déposées par pulvérisation cathodique sur les contacts et les électrodes. La couche de chrome sert ici d'inhibiteur pour la croissance du diamant, sachant que la nucléation est rendue difficile sur ce dernier [247]. Cette dernière croissance est réalisée dans le bâti NIRIM selon les conditions décrites dans le Tableau A1-0-5.

Tableau A1-0-5 : Récapitulatif des conditions de température, de pression et de mélange gazeux d'hydrogène, de méthane et de diborane pour la croissance du diamant non involontairement dopé (NID) dans le bâti NIRIM sous une puissance de 250W [246].

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T= 700°C ; P= 30 torr ; t= 30 min
Croissance du diamant	T= 890°C ; P= 30 torr ; C/H 0,5% t= 180 min
Plasma hydrogène final	T= 700°C ; P= 30 torr ; t= 30 min

A la suite de cette ultime croissance la matrice est plongée dans un bain d'acide fluorhydrique (HF) fortement concentré pour éliminer la couche de silice sacrificielle et révéler ainsi les surfaces de connexions et les microélectrodes [246]. Ces dernières sont ensuite nettoyées avec un mélange d'acide sulfurique ; d'acide nitrique et acide perchlorique avec des proportions respectives en volume de 3 :4 :1. Pour finaliser la fabrication de la matrice de microélectrodes, les surfaces dédiées aux contacts électriques sont recouvertes successivement de 40nm de titane, 50nm de platine et 60nm d'or qui permettent une bonne liaison et évitent la passivation du contact [245].

A-1.3 Test de fonctionnalisation et caractérisations du diamant

A-1.3.1 Fonctionnalisation du diamant

Le diamant synthétique représente un matériau attractif pour des interfaces biologiques, en particulier pour des applications de transduction électrochimiques et biochimiques. De nombreuses études montrent la possibilité de fonctionnaliser le diamant à partir des différents états de surface du diamant oxydé ou hydrogéné [248, 249] pour obtenir des sondes liées de manière covalente sur la surface de diamant [250]. La méthode développée au sein du laboratoire est un greffage spontané d'amine sur le diamant de manière directe [251].

La réalisation de ce greffage sur un morceau de diamant dopé de 160 nm de côté, se base sur le caractère réducteur du diamant hydrogéné. Le milieu de greffage est constitué d'une solution tampon de phosphate de sodium dibasique 0,2 M contenant 20% de glycérol et ajustée à un pH de 10, dans lequel est dissous de la biotine-(PEG)₈-aminée à une concentration de 3 mM. La présence de glycérol permet de limiter l'évaporation de la goutte mise en contact avec la surface du diamant durant 30 minutes. L'échantillon de diamant est ensuite rincé à l'eau pure puis séché à l'argon.

Pour réaliser la révélation par microscopie de fluorescence, la surface de diamant fonctionnalisée par la biotine est alors bloquée avec une solution du sérum d'albumine bovin (BSA) à 10g.L⁻¹ pendant 15 minutes, puis rincée avec une solution de tampon phosphate (PBS). La streptavidine liée à une sonde fluorescente : StreptAvidine-R-Phyco-Erythrine (SAPE) est déposée sur la surface de diamant afin de se coupler avec la biotine. Un dernier rinçage avec du PBS est réalisé en vue d'éliminer les adsorptions non spécifiques. L'analyse de l'adsorption du complexe biotine-SAPE est effectuée sous microscope à fluorescence à une longueur d'ondes d'absorption 565 nm. Les étapes sont résumées dans la Figure A1-8. L'image de fluorescence obtenue permet de confirmer la fonctionnalisation du diamant Figure A1-8A.

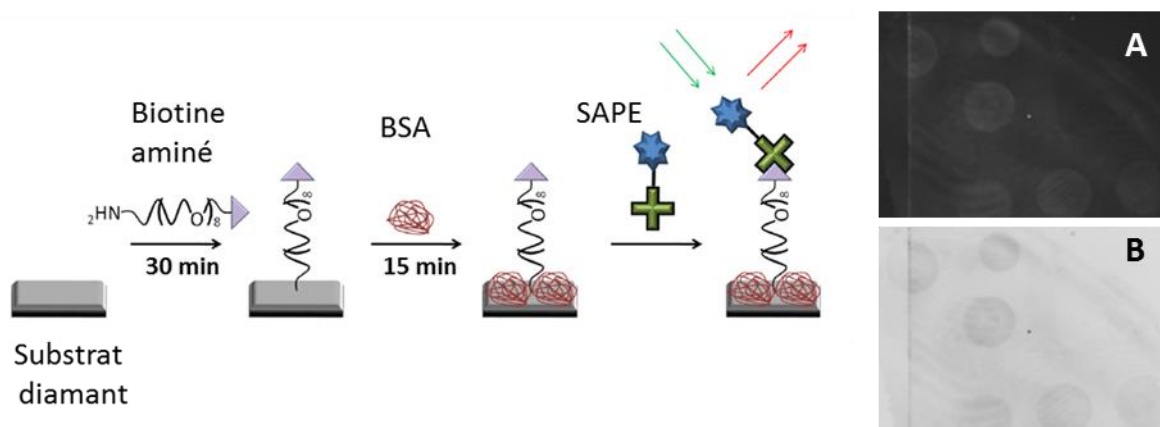


Figure A1-8 : Représentation schématique du greffage de la biotine-(PEG)₈-aminée, suivi de l'étape de blocage des sites non spécifiques par la BSA puis du couplage de la biotine avec la SAPE dont le fluoro-chrome est excitable [224]. A : Image de fluorescence obtenue après fonctionnalisation de la surface de diamant durant 30 minutes avec de la biotine et après adsorption de la sonde fluorescente de streptavidine, les zones fonctionnalisées sont de couleur grise; B : Image en couleur inversée.

A-1.3.2 Méthodes de caractérisations optiques

A-1.3.2.1 Microscopie à balayage électronique

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique basée sur le principe d'interaction électrons-matière afin d'imager la surface d'un matériau. Afin de réaliser ces mesures, un faisceau focalisé d'électrons incidents balaie la surface de l'échantillon à analyser tandis qu'un détecteur récupère, de manière synchrone, l'intensité du signal de réponse réémis pour reconstituer l'image souhaitée. L'image MEB est une image reconstituée par la

cartographie d'intensité du signal mesuré. Une image topographique de l'échantillon est obtenue par la mesure des électrons secondaires émis tandis que la mesure des électrons rétrodiffusés permet d'obtenir une image de l'analyse chimique qualitative de l'échantillon, à partir d'un contraste de phase. Cette méthode optique a été utilisée dans notre cas à l'aide d'un MEB Zeiss Ultra 55 pour caractériser la surface des échantillons de diamant.

Les images ci-dessous, Figure A1-9, présentent différents échantillons dont un soumis uniquement à une phase de nucléation et un autre échantillon caractérisé après la croissance de 1 μm d'épaisseur d'un film poly cristallin de diamant intrinsèque.

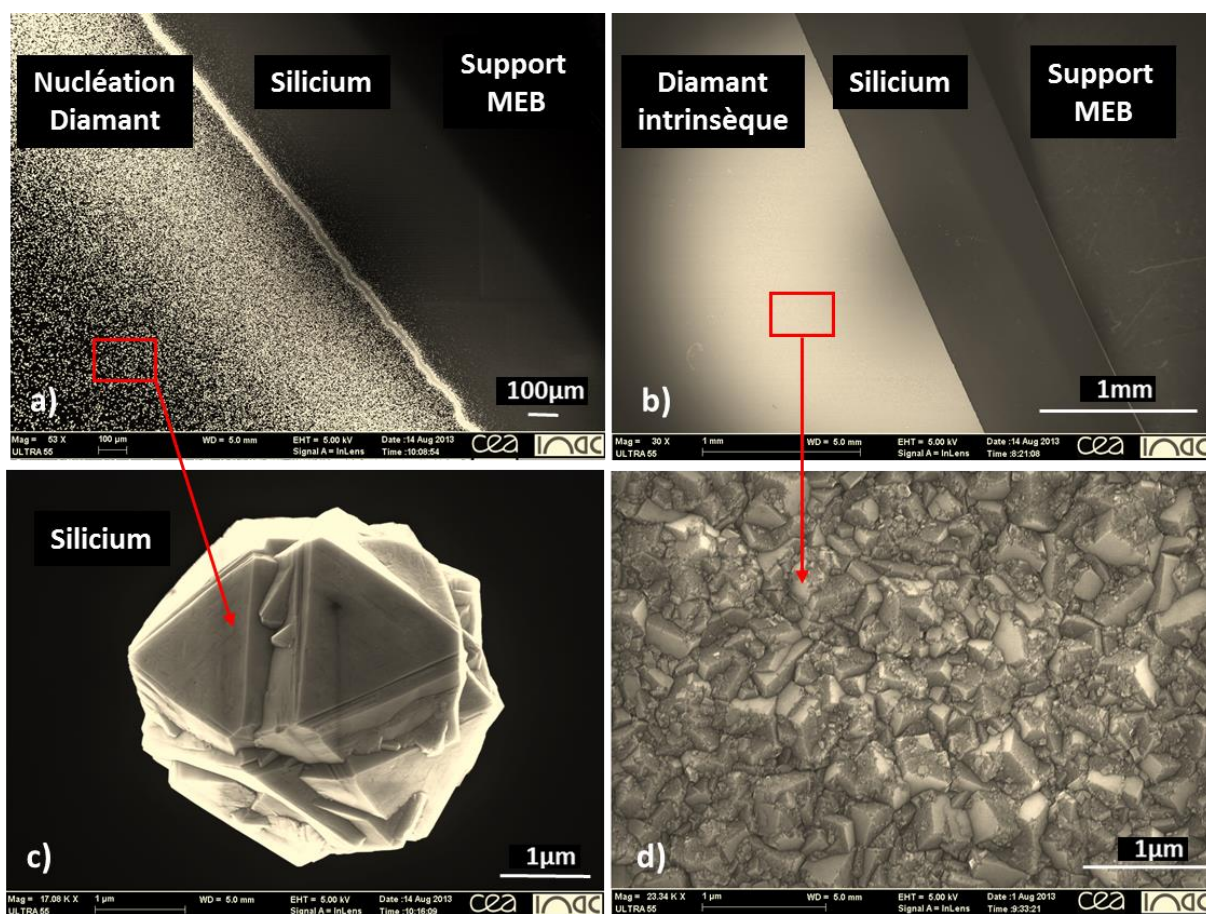


Figure A1-9 :a) Image MEB d'une nucléation de diamant intrinsèque par BEN sur un substrat de silicium (grandissement $\times 43$) b) Image MEB d'une couche de diamant intrinsèque sur un substrat de silicium (grandissement $\times 30$). c) Image MEB d'un nucléi de diamant (grandissement $\times 17\,000$) d) Image du film de diamant intrinsèque (grandissement $\times 23\,000$)

A-1.3.2.2 Spectroscopie Raman

Nous avons complété cette caractérisation par une analyse en spectroscopie Raman. Cette technique optique non destructive [252], utilise le principe de la diffusion inélastique de photons, en impliquant l'échange d'énergie lumière-matière. Ce phénomène de diffusion fait donc suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique incident, qui génère un dipôle induit

rayonnant. Ce dipôle induit est lié à la polarisabilité des molécules et correspond à une déformation de son nuage électronique. Par cette méthode de spectroscopie Raman, on met donc en évidence les vibrations moléculaires. La spectroscopie Raman peut être utilisée pour tous les matériaux qu'ils soient solides, liquides ou gazeux et permet d'obtenir diverses informations sur l'échantillon comme sa structure, les espèces chimiques présentes [253]. Dans le cadre de notre étude, la spectrométrie Raman permet de définir la quantité de phase non diamant présente dans nos échantillons et aussi de vérifier sa qualité cristalline.

Les mesures de spectre Raman ont été réalisées sur l'appareillage T 64000 (Horiba - Jobin & Yon) à température ambiante et sous pression atmosphérique. La source monochromatique stable de 488nm ou de 514nm, est issue d'un laser Argon. L'étude par la spectroscopie Raman des films synthétiques de diamant sur silicium, caractérise les atomes composant le cristal par la position des pics sur le spectre tandis que la largeur à mi-hauteur des pics permet d'obtenir des informations sur le réseau cristallin telles que son organisation ou ses défauts. Ainsi une largeur à mi-hauteur de moins de 5cm^{-1} correspond à un ordre cristallin de bonne qualité comportant peu de défaut [224, 254]. Les raies caractéristiques du diamant intrinsèque synthétisé, (Figure A1-10) sont :

- Le pic à $521,5\text{ cm}^{-1}$ correspond au premier ordre Raman du silicium, substrat utilisé pour l'ensemble des croissances.
- Le pic à 1332 cm^{-1} représente le premier ordre Raman du diamant et résulte des vibrations du réseau de liaison rigide sp^3 [255]. La largeur à mi-hauteur de ce pic décrit la qualité du cristal ; pour un diamant monocristallin pur et sans défaut, cette largeur est de 2 cm^{-1} ; tandis qu'elle varie de 5 à 20 cm^{-1} pour les films poly-cristallins non dopés [246].
- L'épaule à 1350 cm^{-1} correspond à la bande D, et caractérise le carbone amorphe des phases sp^2 et sp^3 du diamant. Cette bande est notamment présente sur le spectre Raman de diamant composé de nombreux joints de grains tel que le diamant nanocristallin. La position de cette bande D évolue en fonction de la longueur de l'onde incidente. Elle se positionne ainsi à 1314 cm^{-1} , 1352 cm^{-1} et 1370 cm^{-1} pour des sources d'incidence de 785nm ; 532nm et 325nm [224].
- Une autre bande, dite bande G, se situe entre 1580cm^{-1} et 1600cm^{-1} . Elle caractérise le graphite, carbone hybridé sp^2 dont les défauts de structure peuvent faire apparaître sur un second pic situé vers 1620 cm^{-1} et appelé bande D2.

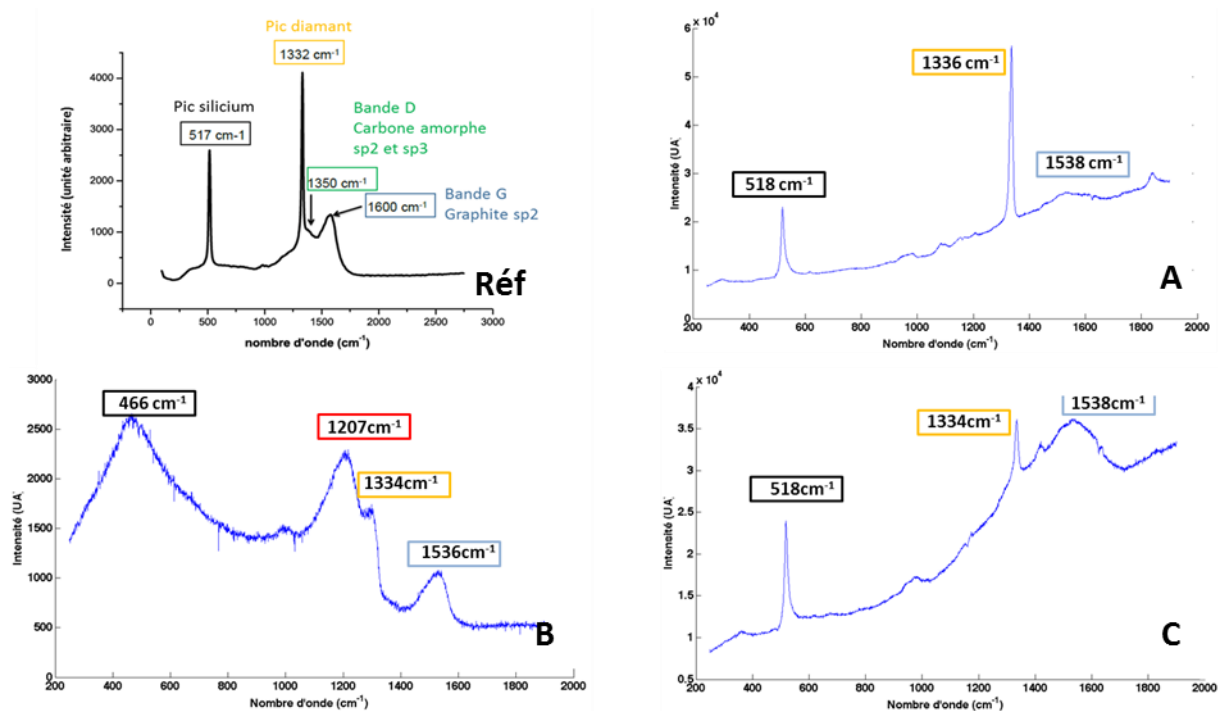


Figure A1-10 : Réf. Exemple de spectre Raman type d'un film de diamant nanocristallin pour une excitation à 325nm [246] encadré en rouge. Représentations des spectres Raman obtenu pour 3 échantillons différents.

Les échantillons A et C représentent des films de diamant intrinsèques dont l'épaisseur est insuffisante pour atténuer le signal du substrat de silicium. Le spectre de l'échantillon A montre une forte proportion de diamant intrinsèque de bonne qualité. En effet le pic correspondant au graphite est beaucoup plus faible. En revanche dans l'échantillon C, la proportion de graphite est bien plus importante, ce qui révèle une mauvaise croissance de l'échantillon liée à des problèmes de stabilité du plasma au cours de l'expérience. Le spectre Raman B représente un échantillon de diamant dopé aux atomes de bore. Le pic caractéristique de ce dopage se situe aux alentours de 1220 cm^{-1} . L'épaulement situé à 1334 cm^{-1} correspond probablement au signal de diamant non dopé tandis que le large pic situé à 1536 cm^{-1} correspond à la bande G (sp² graphitique). Ces observations correspondent aux observations réalisées par Clément Hébert mais il semblerait que la raie représentant le silicium situé à 466 cm^{-1} devrait être située davantage vers 500 cm^{-1} .

A ces analyses spectroscopiques, s'ajoute une caractérisation de nos matériaux par des méthodes électrochimiques comme la voltampérométrie cyclique à balayage linéaire en potentiel.

A-1.3.2.3 Méthodes électrochimiques

A-1.3.3.1 La voltampérométrie cyclique

Le principe de la voltamétrie cyclique (VC) est une méthode d'étude des propriétés électrochimiques d'une électrode au cours d'un balayage de tension. Elle est réalisée ici par un montage à trois électrodes constituées de notre réseau de microélectrodes diamant (électrodes de travail) contenant également les contre électrodes auxquelles est ajoutée une électrode de référence en chlorure-argent. L'ensemble du système électrochimique est commandé par un potentiostat BioLogic relié à un ordinateur piloté par le logiciel EC-LAB [246].

La courbe obtenue, appelée voltammogramme, décrit l'intensité du courant mesuré en fonction du potentiel imposé. Les pics de courants observés sur cette courbe, correspondent aux potentiels de réduction ou d'oxydation d'analytes ayant réagi dans l'intervalle de balayage. Le courant mesuré résulte d'un courant capacitif généré par l'interface électrode-solution (double couche électrique) et d'un courant faradique lié au processus d'oxydo-réduction. Le courant mesuré est donc fonction de la concentration en espèces analysées mais aussi des différents paramètres tels que la vitesse de balayage ; la vitesse de la réaction des espèces chimiques en solution avec l'électrode de mesure comme le montre la Figure A1-11, ci-après.

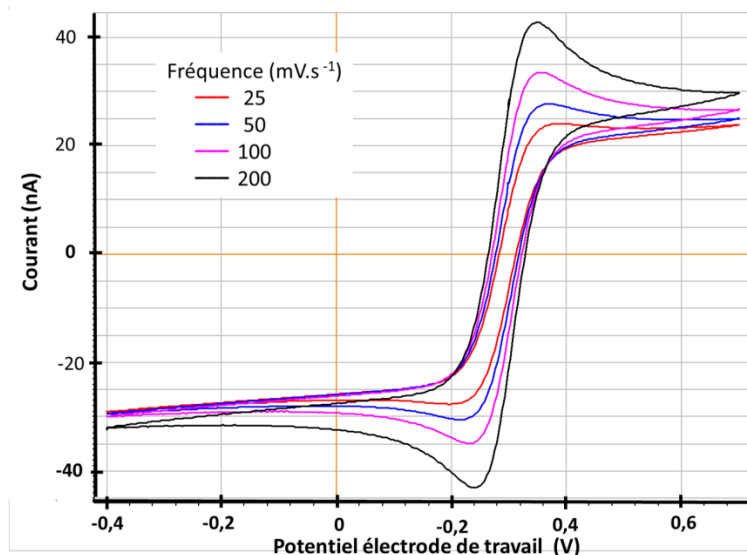


Figure A1-11 : Exemple de voltammogramme pour observation, les variations d'intensité des pics d'oxydoréduction d'une sonde rédox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ à 6mM dans une solution tampon de PBS à 0,01M en fonction des vitesses de balayage comprises entre 25 et 200mV.s⁻¹. L'intensité des pics d'oxydoréduction diminue lorsque la fréquence appliquée est réduite

L'utilisation d'une sonde rédox connue comme étant un système réversible, permet également de déterminer les propriétés de surface du matériau par l'évaluation du comportement de cette sonde sur la surface étudiée (électrodes diamant ou lames d'or fonctionnalisées). Dans le cas d'un système électrode/sonde rédox présentant un comportement rapide, réversible, monoélectronique et une diffusion linéaire infinie, la différence de potentiel de demie-vague mesurée est proche de 60mV à 25°C [256].

Pour de larges surfaces d'électrode, l'intensité des pics va dépendre de manière importante de la vitesse de balayage [257] ainsi que de la vitesse de transfert de charge électrode/sonde rédox. En revanche pour des surfaces plus petites telle que des microélectrodes de moins de 50µm, l'intensité très faible des pics est liée au phénomène de diffusion de type hémisphérique des espèces réactives vers la microélectrode [257]. Nous avons donc utilisé la relation la proportionnalité du courant limite avec la surface de la microélectrode pour établir le rayon expérimental de nos microélectrodes selon la formule suivante

$$I_{lim} = 4nrFDC$$

Avec I_{lim} le courant limite; r : le rayon de l'électrode (ou la surface réagissant); F : la constante de Faraday (96485,34 C.mol⁻¹); D : le coefficient de diffusion du couple redox dans l'eau (D (Fe(CN₆)³⁻/⁴⁻ = 6,67.10⁻⁶ cm².s⁻¹) et C : la concentration du couple redox en mol.cm⁻³.

Nous avons ainsi pu établir une diminution moyenne entre 25 et 30% de la surface des microélectrodes de diamant, la surface réelle des microélectrodes est donc comprise entre 42 et 45 µm de diamètre. Comme le montre la Figure A1-12, cette différence de diamètre entre la valeur théorique et expérimentale peut être issue du procédé de fabrication avec le dépôt de diamant intrinsèque sur une partie de la microélectrode. Cependant la mise en œuvre de la fabrication étant identique pour l'ensemble des microélectrodes, ces variations de surfaces devraient être identiques. Une autre hypothèse peut expliquer cette légère variation d'une électrode à l'autre. En effet il est possible que la structure de l'électrode définie lors de la gravure et lors de la croissance sélective varie entre deux électrodes et qu'elle soit également plus ou moins enclavée dans la structure du diamant. La différence de hauteur entre la microélectrode de diamant et la surface supérieure du diamant intrinsèque, d'environ 1µm, peut engendrer des effets de bord lors de la diffusion hémisphérique de la sonde redox, diminuant par conséquent la surface déterminée expérimentalement.

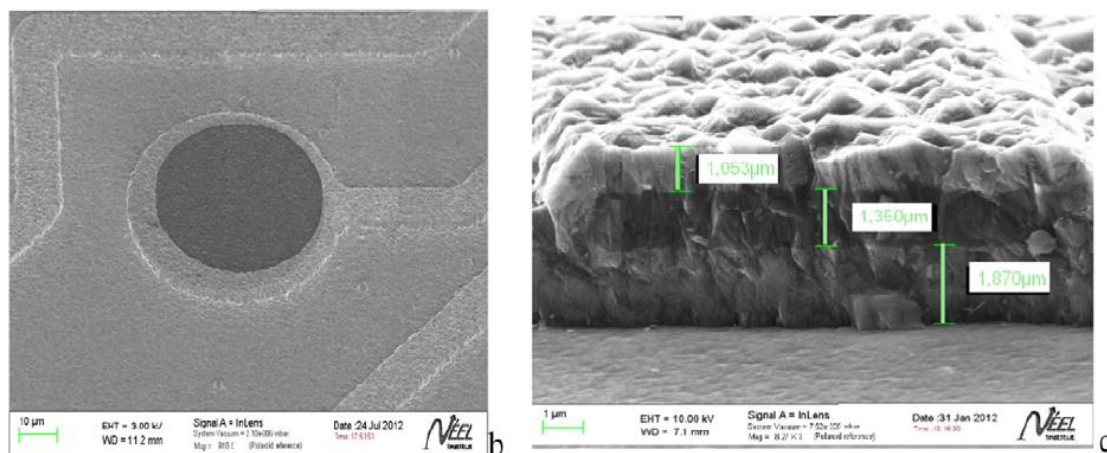


Figure A1-12 : Image MEB d'une microélectrode de diamant et d'une piste clivée verticalement afin d'établir les épaisseurs de films déposées de diamant intrinsèque et de diamant dopé [245].

Nous avons également caractérisé la surface de nos microélectrodes par impédance électrochimique afin d'établir le circuit équivalent associé aux microélectrodes.

A-1.3.3.2 L'impédance électrochimique

Dans le domaine de l'interfaçage biologique, l'impédance électrochimique des électrodes doit être la plus faible possible pour ne pas engendrer de bruit thermique trop important qui tendrait à rendre toutes mesures difficiles. La spectroscopie d'impédance électrochimique permet de définir les propriétés de la surface de l'électrode lorsque celle-ci est mise en présence d'un couple oxydo-réducteur rapide. Les courbes générées peuvent être représentées selon la représentation de Nyquist ou selon celle de Bode (Figure A1-13).

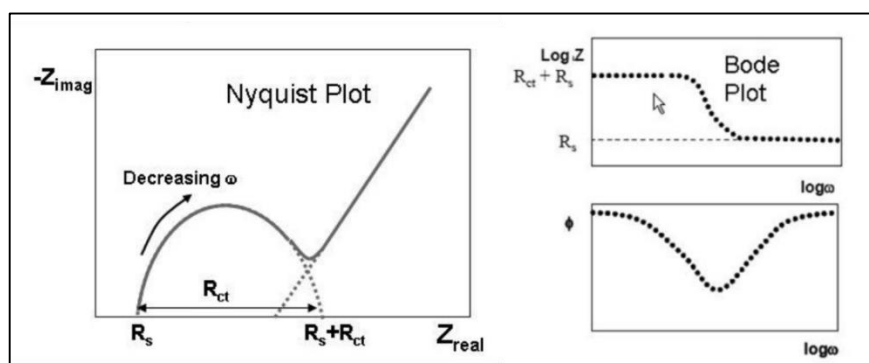


Figure A1-13 : Représentations des diagrammes de Nyquist et de Bode[246]

L'interphase électrode-solution est alors modélisée par un circuit électrique équivalent, le plus souvent le schéma-électrique de Randle est utilisé [257]. Ce circuit se compose :

- d'une résistance à l'électrolyte R_e

- d'une résistance au transfert de charge (RT) entre l'électrode et la solution qui permet de déduire la réactivité des électrodes grâce au transfert de charge [258], via l'équation :

$$RT = \frac{R \cdot T}{n^2 \cdot F^2 \cdot k_0 \cdot C}$$

Avec R : la constante des gaz parfaits ($8,3144621 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) ; T : la température du milieu ; n : le nombre d'électrons échangés ; F: la constante de Faraday ($96\,485,34 \text{ sA} \cdot \text{mol}^{-1}$); k_0 : constante de vitesse de transfert de charge ; C : la concentration des espèces oxydo-réductrices en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Dans le cas d'un système idéal la surface de diamant peut être associée à un circuit composé d'une résistance et d'un condensateur. Cependant il arrive souvent que le condensateur soit assimilé à un CPE (« Constante Phase Element ») lorsque la surface n'est pas homogène par exemple. Dans notre cas le circuit associé aux microélectrodes se compose d'une résistance à l'électrolyte, de la capacité de double couche du diamant ainsi que d'une résistance au travers de charge et d'un Warburg associé à la diffusion mais également d'un second circuit associé à la résistance et à l'effet capacitif des fils, des pistes et des surfaces de diamant non utilisées, comme l'illustre le circuit de Randles ci-dessous (Figure A1-14 : Schéma du circuit équivalent du système de microélectrode diamant.

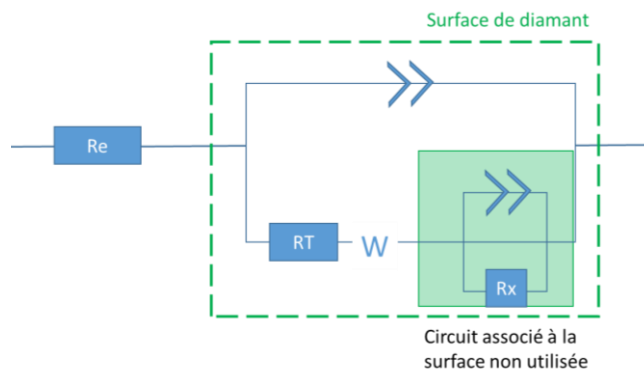


Figure A1-14 : Schéma du circuit équivalent du système de microélectrode diamant

A-1.4 Conclusion

En conclusion les travaux réalisés pour l'obtention d'un réseau microélectrodes par les méthodes de croissance par CVD assisté par plasma microonde ont permis d'obtenir du diamant intrinsèque isolant et un diamant dopé au bore présentant des propriétés électroniques intéressantes pour leur utilisation dans le domaine de l'électrochimie. Nous avons pu également caractériser physiquement les dépôts réalisés soit de manière optique par les méthodes de spectroscopie Raman et microscopie à balayage électronique, soit de manière électrique par la voltamétrie cyclique et l'impédance électrochimique. Nous avons ainsi pu établir les variations de fabrication pouvant être générées lors des différents procédés, comme la diminution de la surface active de l'électrode ou son enclavement dans la matrice de diamant. Un schéma du circuit équivalent de Randles a été associé aux microélectrodes. A noter que ce système de microélectrodes a également été fonctionnalisé par des nanotubes de carbone afin d'être utilisé comme système interface neuronal.

Annexe 2 Les bâtis de croissance diamant

A-2.1 Bâti SEKI

Le bâti de croissance SEKI utilise la technique de dépôt vapeur en phase chimique assistée par plasma micro-onde (dite MPCVD) pour réaliser uniquement les étapes de nucléation du substrat et la synthèse de diamant intrinsèque, c'est-à-dire non dopé.

Description du réacteur

Le système se compose de divers éléments :

- D'un générateur à micro-onde qui génère une onde électromagnétique en transverse électrique de 2,45Ghz de fréquence et d'une puissance pouvant atteindre 1500W.
- D'un guide d'ondes afin d'adapter l'impédance de sortie de l'onde.
- D'une cavité résonante en inox contenant un quartz et permettant de créer le plasma.
- D'un porte-substrat pouvant être polarisé et chauffé par induction. Le système de chauffage est couplé à un système de refroidissement par circulation d'eau afin de mieux contrôler la température.
- De contrôleurs de débit massique afin de réguler les flux.

Remarque : la taille des échantillons ne doit pas excéder 4 pouces.

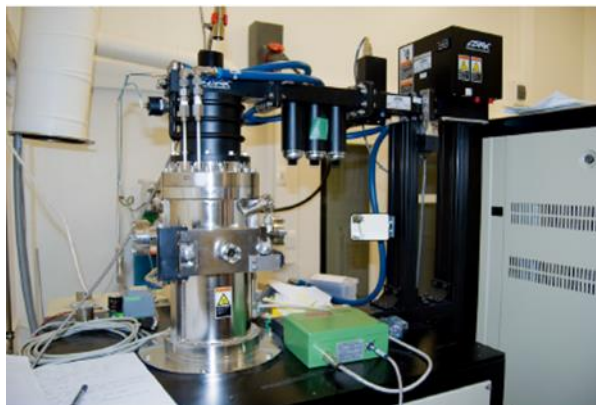


Figure A2-1 : Photographie du bâti de croissance SEKI

Conditions de croissance

L'ensemble des croissances de diamant intrinsèque de notre étude a été réalisé sur un substrat non diamant : le silicium. Afin d'améliorer le début de croissance du diamant par hétéro-épitaxie, des germes de diamant doivent être présents à la surface, afin que les espèces carbonées du procédé de CVD puissent s'accrocher. Cette étape essentielle de germination est également appelée nucléation. Dans le cas de l'hétéro-épitaxie, la nucléation principale permet

d'obtenir des germes de diamant sur la surface de silicium grâce à une poudre de diamant, ou par application d'un champ électrique sur le substrat en début de procédé (Bias Enhanced Nucleation ou BEN) [231, 259, 260].

C'est cette dernière méthode de polarisation du substrat qui a été utilisée pour réaliser la nucléation principale de nos échantillons de silicium.

Tableau A2-0-1 Récapitulatif des conditions de température (T), de pression (P), de la polarisation (BAIS) et de mélange gazeux d'hydrogène (H) et de méthane (C) pour la croissance du diamant intrinsèque dans le bâti SEKI sous une puissance de 1000W.

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 3min ;
Nucléation par BEN	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 10min C/H= 5% BAIS= -260 V
	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 2min C/H= 5% BAIS= -400 V
	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 10min C/H= 5% BAIS= -260 V

La croissance du diamant sur du substrat avec des nucléations peut être réalisée à posteriori ou de manière consécutive ; dans ce cas l'étape de pré plasma hydrogène pour nettoyer la surface n'est pas effectuée.

Tableau A2-2 : Récapitulatif des conditions de température (T), de pression (P) et de mélange gazeux d'hydrogène (H), de méthane (C) et de diborane (B) pour la croissance du diamant dopé au bore dans le bâti NIRIM sous une puissance de 270W [246]. Les lettres C, H et B représente respectivement les gaz de méthane, de dihydrogène et de bore

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T=700 °C ; P= 18 torr ; t= 3min ;
Croissance de diamant intrinsèque	T=700 °C ; P= 30 torr ; t= 90min C/H= 1%

Remarque : Les échantillons sont préalablement nettoyés avant les étapes de croissance afin de limiter toute contamination.

A-2.2. Bâti NIRIM

Dans ce second réacteur sont réalisées les croissances de diamant dopé au bore. Mais ce bâti est également utilisé pour faire des croissances de diamant non intentionnellement dopées (NID), c'est-à-dire des diamants qui ont incorporé lors de la croissance des contaminations résiduelles de bore contenues dans le réacteur. Le diamant NID possède alors des concentrations de bore inférieures à $10^{15} \text{atm.cm}^{-3}$.



Figure A2-2 : Photographie du bâti de croissance NIRIM

Description réacteur NIRIM

Le réacteur de croissance utilisé pour le dopage du diamant de type p, emploie également la technique de dépôt vapeur en phase chimique assistée par plasma micro-onde (dite MPCVD). Il a été mis au point dans le laboratoire à partir d'un modèle japonais du National Institute for Research in Inorganic Materials (NIRIM) [261, 262].

Le système est doté :

- d'une chambre de réaction constituée de deux tubes en quartz amovibles dans lesquels transite le mélange des précurseurs gazeux. Il est ainsi possible d'éviter la contamination de l'échantillon au Bore résiduel lors de croissances de diamant intrinsèque ou faiblement dopé en changeant les tubes en fonction des croissances réalisées.
- d'un générateur micro-onde capable de fournir une puissance maximale de 2000W. L'onde générée est ici directement envoyée au travers d'un guide d'ondes vers la chambre réactionnelle. Le plasma est alors formé au niveau de l'intersection entre le guide d'ondes et le tube de quartz du réacteur. La puissance de l'onde générée contrôle également la température du procédé, tout comme la pression dans l'enceinte du réacteur. Les températures nécessaires étant de l'ordre de 800°C, la puissance appliquée est comprise entre 250 et 400W. La température, elle-même reliée à la pression, influe sur les réactions mises en jeu ainsi que sur la physico-chimie des espèces. Il est donc essentiel de contrôler ce paramètre de température. Un pyromètre est positionné en haut du tube de quartz afin d'effectuer des mesures directement sur le substrat.
- d'un porte-substrat en quartz dont la position est réglable dans les 3 dimensions de l'espace afin de s'adapter au mieux au plasma formé.

- de contrôleurs de débit massique pour la régulation du flux de gaz (hydrogène, méthane, diborane). Une ligne de dilution spécifique au diborane est également présente, puisque les concentrations requises pour ce gaz sont très faibles [224].

- un système de pompage secondaire est également employé afin de « dépolluer » le processus de croissance de toutes contaminations pouvant provenir de l'échantillon ou des espèces absorbées sur les parois lors de précédentes croissances.

Remarque : *les échantillons ne doivent pas excéder 1 pouce de côté soit environ 1,6cm.*

Conditions de croissance

Tableau A2-0-3: Récapitulatif des conditions de température, de pression et de mélange gazeux d'hydrogène, de méthane et de diborane pour la croissance du diamant non involontairement dopé (NID) dans le bâti NIRIM sous une puissance de 250W

Vide secondaire	Quelques heures
Pré plasma hydrogène	T= °C ; P= 30 torr ; t= 30 min
Croissance du diamant	T= 890°C ; P= 30 torr ; C/H 0,5% t= 180 min

Annexe 3 La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyses non destructive [252], qui utilise le principe de la diffusion inélastique de photons. Ce phénomène de diffusion fait suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique incident, qui génère un dipôle induit rayonnant. Ce dipôle induit est lié à la polarisabilité des molécules et correspond à une déformation de son nuage électronique. Ainsi pour obtenir une diffusion Raman, il faut qu'il y ait une variation de la polarisabilité de la molécule et la libération d'un phonon Raman.

La spectroscopie Raman peut être utilisée pour tous les matériaux qu'ils soient solides, liquides ou gazeux et permet d'obtenir diverses informations sur l'échantillon telles que sa structure, les espèces chimiques présentes ainsi que leurs concentrations par l'analyse du spectre Raman [253]. La représentation de la Figure A3-1 ci-dessous permet d'expliquer les informations qualitatives et quantitatives fournies par une raie Raman.

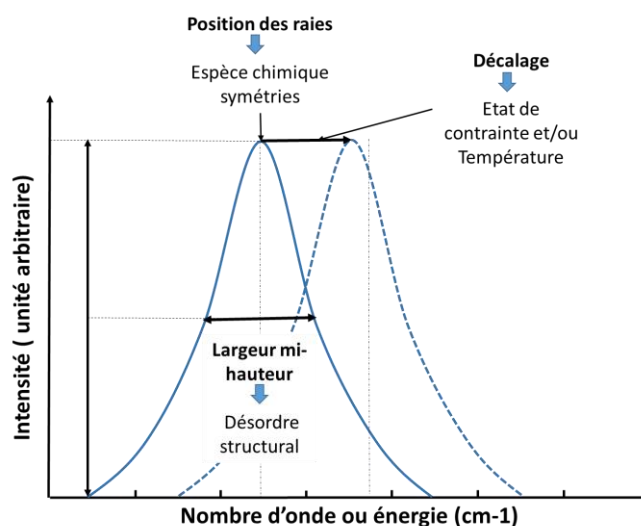


Figure A3-1 : Informations qualitatives et quantitatives d'un échantillon par l'analyse des caractéristiques de hauteur ; de largeur et de positionnement d'une raie Raman [263]

La fréquence et la puissance du laser utilisé sont importantes dans le système, puisque l'élévation locale de la température de l'échantillon peut générer un déplacement des pics, voire même de nouveaux pics dus à la création d'une réaction chimique suite à l'échauffement localisé.

En Raman, l'excitation monochromatique focalisée sur l'échantillon, possède une énergie fixe E_0 supérieure à l'ordre de grandeur des vibrations moléculaires qui est définie par la relation suivante :

$$E_0 = h \times \nu_0 = \frac{h \times c}{\lambda_0}$$

avec h : constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$) ; ν_0 : fréquence de la radiation incidente (Hz) ; c : vitesse de la lumière dans le vide ($3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$) et λ_0 : longueur d'onde de la radiation incidente (m).

Pour le faisceau de lumière incidente, la majorité des photons est transmise, réfléchi ou absorbée par l'échantillon, tandis qu'une bien plus faible partie d'entre eux diffuse comme le montre la Figure A3-2.

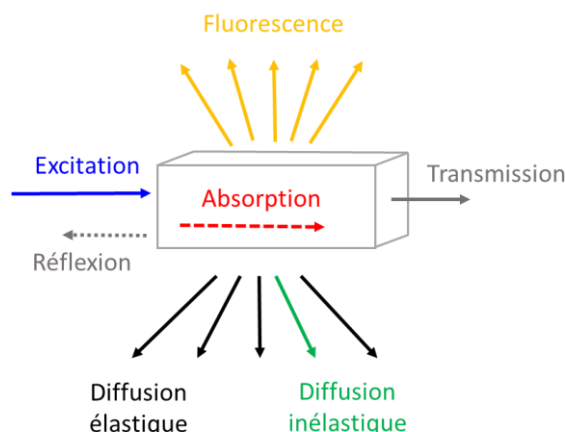


Figure A3-2 : Les différents phénomènes pouvant avoir lieu suite à l'interaction d'un rayonnement excitant avec l'échantillon étudié. L'excitation de la matière génère principalement des phénomènes de transmission ; de réflexion ou d'absorption infrarouge mais aussi à moindres mesures des phénomènes de diffusion de type élastique ; inélastique. Si la fréquence excitatrice est suffisamment élevée, il est possible d'observer également l'émission par fluorescence pour certains matériaux.

L'interaction de la polarisabilité de la molécule (échantillon) avec le photon incident, entraîne un moment dipolaire induit dans la molécule. Cette dernière est alors portée dans un état énergétique élevé dit « état intermédiaire virtuel » pendant une courte durée puis redescend sur un niveau énergétique réel. Cette désexcitation peut être réalisée soit à la même fréquence que celle de l'excitation : c'est la diffusion de Rayleigh (diffusion élastique) ; soit à une fréquence différente à celle de l'excitation : c'est la diffusion Raman [264]. Dans ce second cas il s'agit une diffusion inélastique de type vibrationnel, qui ne représente qu'un photon Raman contre 10^8 photons incidents.

La Figure 0-3 illustre que la diffusion Raman se distingue en deux cas selon la fréquence phonon diffusée. Si la fréquence du phonon diffusé ($\nu_0 - \nu$) est inférieure à celle du photon incident (ν_0), il y a perte d'énergie pour le photon donc gain d'énergie vibrationnelle pour la molécule, c'est la diffusion Raman Stokes. En revanche si le phonon diffusé est à une fréquence plus importante que le photon incident, on parle de diffusion Raman anti-Stokes.

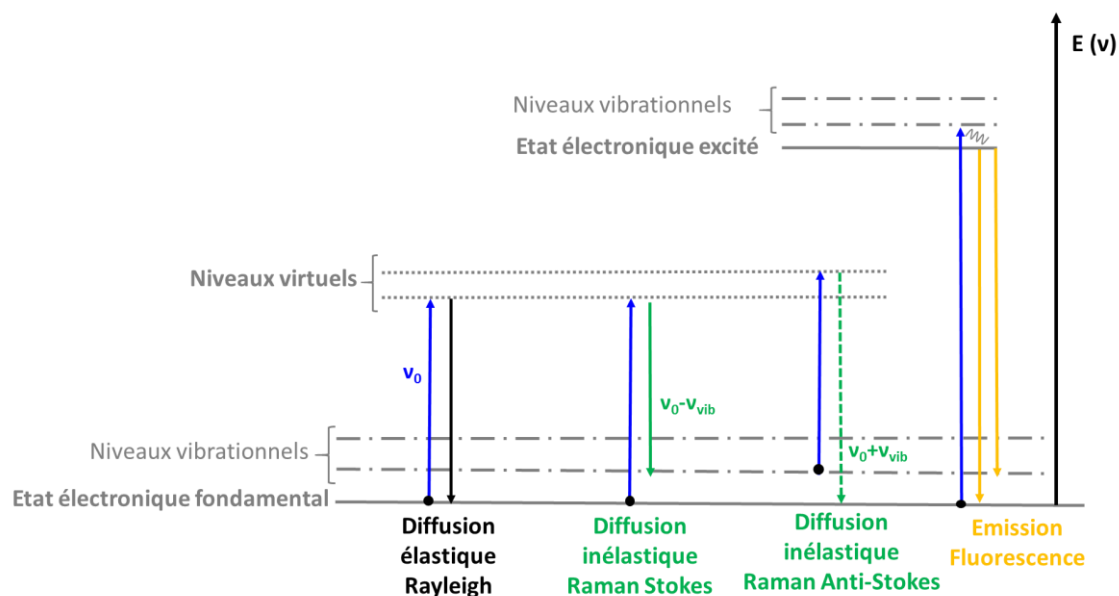


Figure 0-3 : Représentation des différentes transitions énergétiques pouvant avoir lieu lors d'une analyse Raman. ν_0 correspond ici à la fréquence d'excitation du laser tandis que ν_{vib} correspond à la fréquence de vibration de la molécule analysée [263]

Expérimentalement la diffusion de Rayleigh est éliminée grâce à un filtre afin d'obtenir une meilleure intensité pour le processus de diffusion Raman. Cependant la température et la fréquence de l'onde excitatrice, modifient l'intensité des raies de diffusion Raman notamment pour les raies anti-Stokes. La probabilité d'absorption d'un photon (raie anti-Stokes) étant plus faible que la probabilité d'émettre un photon, l'intensité des raies anti-Stokes est bien moins importante que celle des raies Stokes [264].

Le spectre Raman représente donc l'intensité des raies Stokes en fonction de la différence de fréquence entre photon incident et photon diffusé. Cette différence est plus souvent convertie en nombre d'ondes ν par la relation suivante :

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

Avec ν : le nombre d'ondes (cm^{-1}) ; λ : la longueur d'onde incidente (cm) ; ν : la fréquence de l'onde (Hz) et c : la célérité de la lumière de $3 \cdot 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$

Les mesures de spectre Raman ont été réalisées sur l'appareillage T 64000 (Horiba - Jobin & Yvon) à température ambiante et sous pression atmosphérique. La source monochromatique stable de 488nm ou de 514nm, est issue d'un laser Argon. L'étude par la spectroscopie Raman des films synthétiques de diamant sur silicium, caractérise la fréquence de vibration des atomes composant le cristal par la position des pics sur le spectre tandis que la largeur à mi-hauteur

des pics permet d'obtenir des informations sur le réseau cristallin telles que son organisation ou ses défauts. Ainsi une largeur à mi-hauteur de moins de 5 cm^{-1} correspond à un ordre cristallin de bonne qualité comportant peu de défaut [224, 254].

La Figure A3-4 présente les pics caractéristiques du diamant intrinsèque dont nous décrivons la signification ci-dessous :

- Le pic à $521,5\text{ cm}^{-1}$ correspond au premier ordre Raman du silicium, substrat utilisé pour l'ensemble des croissances.
- Le pic à 1332 cm^{-1} représente le premier ordre Raman du diamant et résulte des vibrations du réseau de liaison rigide sp^3 [255]. La largeur à mi-hauteur de ce pic décrit la qualité du cristal ; pour un diamant monocristallin pur et sans défaut, cette largeur est de 2 cm^{-1} ; tandis qu'elle varie de 5 à 20 cm^{-1} pour les films poly-cristallins non dopés [246].
- L'épaule à 1350 cm^{-1} correspond à la bande D, et caractérise le carbone amorphe des phases sp^2 et sp^3 du diamant. Cette bande est notamment présente sur le spectre Raman de diamant composé de nombreux joints de grains tel que le diamant nanocristallin. La position de cette bande D évolue en fonction de la longueur de l'onde incidente. Elle se positionne ainsi à 1314 cm^{-1} , 1352 cm^{-1} et 1370 cm^{-1} pour des sources d'incidence de 785 nm ; 532 nm et 325 nm [224].
- Une autre bande, dite bande G, se situe entre 1580 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} . Elle caractérise le graphite, carbone hybridé sp^2 , dont les défauts de structure peuvent apparaître sur un second pic situé vers 1620 cm^{-1} et appelé bande D2.

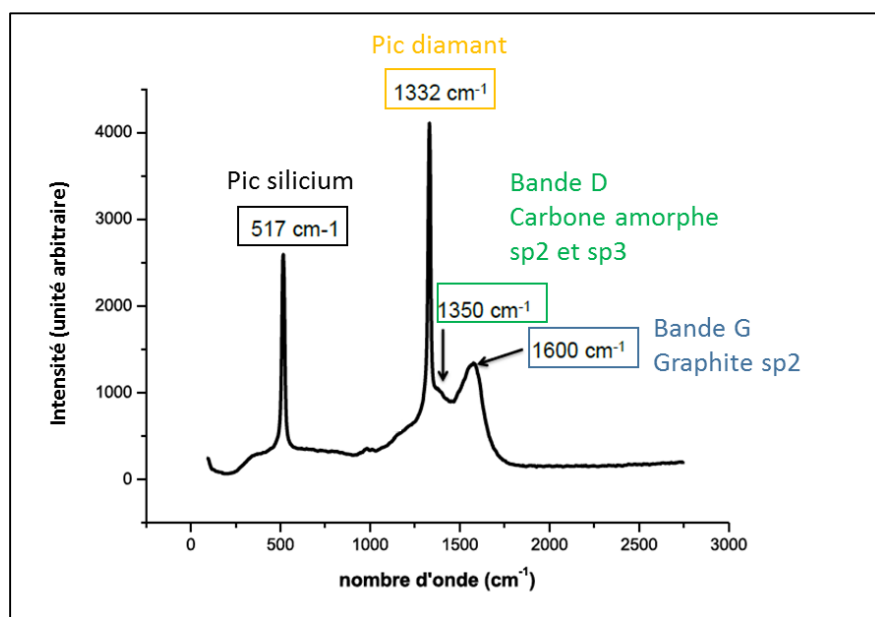


Figure A3-4 : Exemple de spectre Raman type d'un film de diamant nanocristallin pour une excitation à 325 nm [246].

Annexe 4 Plan de dépôt des 11 mélanges de solution pour les récepteurs combinatoires

Afin de constituer les 11 récepteurs combinatoires, nous avons réalisé 11 mélanges de briques de bases (lactose et lactose sulfate) déposé sur le prisme à 4 reprises pour chacun des ratios. La Figure A4-1 représente le plan de dépôt réalisé où chaque couleur représente un ratio de mélange. Le chiffre intérieur décrit le ratio de lactose par rapport au lactose sulfate (exemple le ratio 19 correspond au mélange de 10% de lactose avec 90% de lactose-sulfate (v/v)). Nous avons défini cette matrice en plaçant les 4 réplicats dans des zones différentes de la cuve

fluidique comme au centre, en entrée ou en sortie. Cette répartition nous permet d’être davantage reproductible dans la réalisation du réseau de récepteurs et de pouvoir comparer nos résultats d’une expérience à l’autre.

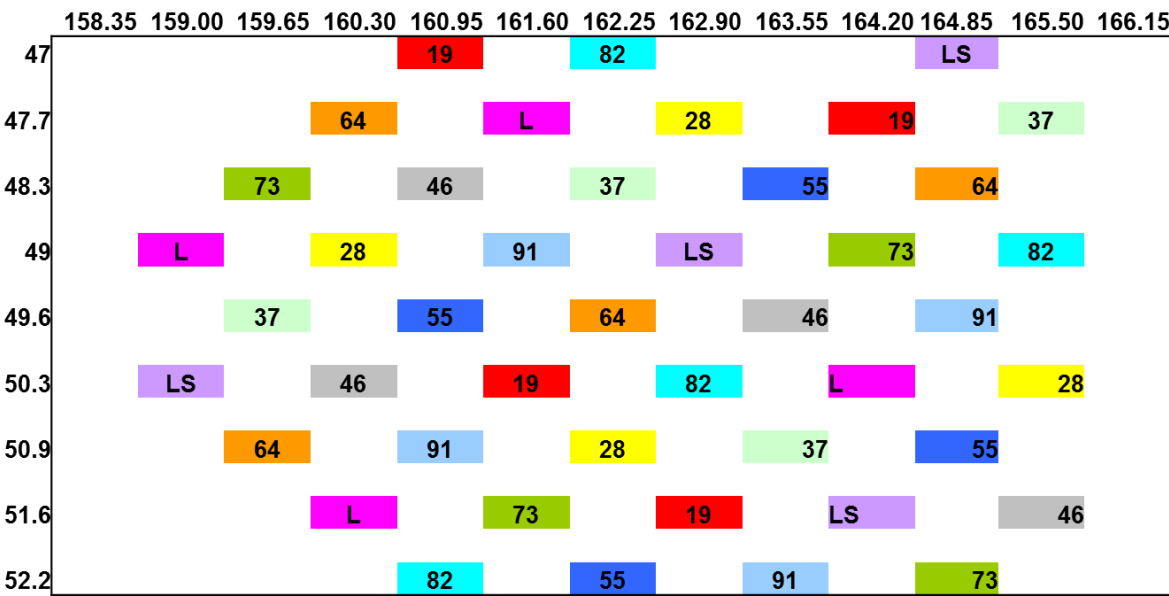


Figure A4-1 : Représentation schématique du plan de dépôt du réseau de récepteurs combinatoires à réactivités croisées.

Bibliographie

1. Gardner, J.W. and Bartlett, P.N., *Sensors and sensory systems for an electronic nose*. 1992: Springer, **ISBN**: 0792316932.
2. Wilson, A.D. and Baietto, M., *Applications and advances in electronic-nose technologies*. *Sensors*, **2009**. 9(7): p. 5099-5148.
3. Gardner, J.W. and Bartlett, P.N., *A brief history of electronic noses*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1994**. 18(1): p. 210-211.
4. Thèse: Cherif, B., *Des puces à protéines/peptides pour des applications en recherche fondamentale et clinique*, 2006.
5. Thèse: Ayela, C., *Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézo-électriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel*, 2007.
6. Cherif, B., Roget, A., Villiers, C.L., Calemczuk, R., Leroy, V., Marche, P.N., Livache, T. and Villiers, M.B., *Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging*. *Clinical Chemistry*, **2006**. 52(2): p. 255-262.
7. Maalouf, R., Soldatkin, A., Vittori, O., Sigaud, M., Saikali, Y., Chebib, H., Loir, A., Garrelie, F., Donnet, C. and Jaffrezic-Renault, N., *Study of different carbon materials for amperometric enzyme biosensor development*. *Materials Science and Engineering: C*, **2006**. 26(2): p. 564-567.
8. Le, M.H., Fradetal, L., Delabougli, D., Mai, A.T. and Stambouli, V., *Fluorescence and Label Free Impedimetric DNA Detection on SnO₂ Nanopillars*. *Electroanalysis*, **2015**. 27(5): p. 1210-1218.
9. Yang, Z., Laurenceau, E., Chevolot, Y., Ataman-Oenal, Y., Choquet-Kastylevsky, G. and Souteyrand, E., *Cancer Biomarkers Detection Using Microstructured Protein Chip: Implementation of Customized Multiplex Immunoassay*. *Euroensors Xxv*, **2011**. 25.
10. El Khoury, G., Laurenceau, E., Chevolot, Y., Merieux, Y., Desbos, A., Fabien, N., Rigal, D., Souteyrand, E. and Cloarec, J.-P., *Development of miniaturized immunoassay: Influence of surface chemistry and comparison with enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot*. *Analytical Biochemistry*, **2010**. 400(1): p. 10-18.
11. Chevolot, Y., Laurenceau, E., Phaner-Goutorbe, M., Monnier, V., Souteyrand, E., Meyer, A., Gehin, T., Vasseur, J.-J. and Morvan, F., *DNA directed immobilization glycocluster array: applications and perspectives*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2014**. 18: p. 46-54.
12. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L.B., *Combinatorial receptor codes for odors*. *Cell*, **1999**. 96(5): p. 713-723.
13. Oyelaran, O. and Gildersleeve, J.C., *Glycan arrays: recent advances and future challenges*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**. 13(4): p. 406-413.
14. Keller, P.E., Kangas, L.J., Liden, L.H., Hashem, S., Kouzes, R.T. and Ieee. *Electronic noses and their applications*. in *Ieee Technical Applications Conference and Workshops at Northcon*. 1995. New York: I E E E.
15. Zubritsky, E., *E-noses keep an eye on the future*. *Analytical Chemistry*, **2000**. 72(11): p. 421A-426A.
16. Rock, F., Barsan, N. and Weimar, U., *Electronic nose: Current status and future trends*. *Chemical Reviews*, **2008**. 108(2): p. 705-725.

17. Umali, A.P. and Anslyn, E.V., *A general approach to differential sensing using synthetic molecular receptors*. Current Opinion in Chemical Biology, **2010**. 14(6): p. 685-692.
18. Lavigne, J.J. and Anslyn, E.V., *Sensing a paradigm shift in the field of molecular recognition: From selective to differential receptors*. Angewandte Chemie International Edition, **2001**. 40(17): p. 3118-3130.
19. Persaud, K. and Dodd, G., *Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose*. Nature, **1982**. 299(5881): p. 352-355.
20. Thèse: Ramalho, O., *Vers une métrologie olfactive de la qualité de l'air intérieur. Correspondances entre les données de l'analyse sensorielle, de l'analyse chimique et d'un "nez électronique"*, 1999.
21. Krantz-Rülcker, C., Stenberg, M., Winquist, F. and Lundström, I., *Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review*. Analytica chimica acta, **2001**. 426(2): p. 217-226.
22. Di Natale, C., Macagnano, A., Davide, F., D'amico, A., Legin, A., Vlasov, Y., Rudnitskaya, A. and Selezenev, B., *Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue*. Sensors and Actuators B: Chemical, **1997**. 44(1): p. 423-428.
23. Gardner, J.W., Yinon, J. and Division, N.S.A., *Electronic noses & sensors for the detection of explosives*. 2004: Springer, **ISBN**: 1402023170.
24. Woodka, M.D., Schnee, V.P. and Polcha, M.P., *Fluorescent polymer sensor array for detection and discrimination of explosives in water*. Analytical chemistry, **2010**. 82(23): p. 9917-9924.
25. Moretto, L.M. and Kalcher, K., *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*. 2014: Springer, **ISBN**: 149391300X.
26. Gutes, A., Cespedes, F., Del Valle, M., Louthander, D., Krantz-Rülcker, C. and Winquist, F., *A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2006**. 115(1): p. 390-395.
27. Baldwin, E.A., Bai, J.H., Plotto, A. and Dea, S., *Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries*. Sensors, **2011**. 11(5): p. 4744-4766.
28. Imamura, T., Toko, K., Yanagisawa, S. and Kume, T., *Monitoring of fermentation process of miso (soybean paste) using multichannel taste sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, **1996**. 37(3): p. 179-185.
29. Toko, K., *Biomimetic sensor technology*. 2000: Cambridge University Press, **ISBN**: 1139425544.
30. Taniguchi, A., Naito, Y., Maeda, N., Sato, Y. and Ikezaki, H., *Development of a monitoring system for water quality using a taste sensor*. Sensors and Materials, **1999**. 11(7): p. 437-446.
31. Mielle, P., *'Electronic noses': Towards the objective instrumental characterization of food aroma*. Trends in Food Science & Technology, **1996**. 7(12): p. 432-438.
32. El Barbri, N., Llobet, E., El Bari, N., Correig, X. and Bouchikhi, B., *Application of a portable electronic nose system to assess the freshness of Moroccan sardines*. Materials Science and Engineering: C, **2008**. 28(5): p. 666-670.
33. Sim, M.Y.M., Shya, T.J., Ahmad, M.N., Shakaff, A.Y.M., Othman, A.R. and Hitam, M.S., *Monitoring of milk quality with disposable taste sensor*. Sensors, **2003**. 3(9): p. 340-349.
34. Di Natale, C., Paolesse, R., Macagnano, A., Mantini, A., D'Amico, A., Ubigli, M., Legin, A., Lvova, L., Rudnitskaya, A. and Vlasov, Y., *Application of a*

- combined artificial olfaction and taste system to the quantification of relevant compounds in red wine*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2000**. 69(3): p. 342-347.
35. Schaller, E., Bosset, J.O. and Escher, F., *'Electronic noses' and their application to food*. LWT-Food Science and Technology, **1998**. 31(4): p. 305-316.
 36. Fukunaga, T., Toko, K., Mori, S., Nakabayashi, Y. and Kanda, M., *Quantification of taste of coffee using sensor with global selectivity*. Sensors and Materials, **1996**. 8(1): p. 47-56.
 37. Yamada, H., Mizota, Y., Toko, K. and Doi, T., *Highly sensitive discrimination of taste of milk with homogenization treatment using a taste sensor*. Materials Science and Engineering: C, **1997**. 5(1): p. 41-45.
 38. Oh, E.H., Song, H.S. and Park, T.H., *Recent advances in electronic and bioelectronic noses and their biomedical applications*. Enzyme and microbial technology, **2011**. 48(6): p. 427-437.
 39. Wilson, A.D. and Baietto, M., *Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications*. Sensors, **2011**. 11(1): p. 1105-1176.
 40. Kateb, B., Ryan, M., Homer, M., Lara, L., Yin, Y., Higa, K. and Chen, M.Y., *Sniffing out cancer using the JPL electronic nose: A pilot study of a novel approach to detection and differentiation of brain cancer*. NeuroImage, **2009**. 47: p. T5-T9.
 41. Machado, R.F., Laskowski, D., Deffenderfer, O., Burch, T., Zheng, S., Mazzone, P.J., Mekhail, T., Jennings, C., Stoller, J.K. and Pyle, J., *Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath*. American journal of respiratory and critical care medicine, **2005**. 171(11): p. 1286-1291.
 42. D'Amico, A., Pennazza, G., Santonico, M., Martinelli, E., Roscioni, C., Galluccio, G., Paolesse, R. and Di Natale, C., *An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer*. Lung Cancer, **2010**. 68(2): p. 170-176.
 43. Horvath, G., Chilo, J. and Lindblad, T., *Different volatile signals emitted by human ovarian carcinoma and healthy tissue*. Future Oncology, **2010**. 6(6): p. 1043-1049.
 44. Sidbury, J., Smith, E.K. and Harlan, W., *An inborn error of short-chain fatty acid metabolism: the odor-of-sweaty-feet syndrome*. The Journal of pediatrics, **1967**. 70(1): p. 8-15.
 45. Konvalina, G. and Haick, H., *Sensors for breath testing: from nanomaterials to comprehensive disease detection*. Accounts of chemical research, **2013**. 47(1): p. 66-76.
 46. Tisch, U., Schlesinger, I., Ionescu, R., Nassar, M., Axelrod, N., Robertman, D., Tessler, Y., Azar, F., Marmur, A., Aharon-Peretz, J. and Haick, H., *Detection of Alzheimer's and Parkinson's disease from exhaled breath using nanomaterial-based sensors*. Nanomedicine, **2013**. 8(1): p. 43-56.
 47. Dragonieri, S., Annema, J.T., Schot, R., van der Schee, M.P., Spanevello, A., Carratú, P., Resta, O., Rabe, K.F. and Sterk, P.J., *An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD*. Lung Cancer, **2009**. 64(2): p. 166-170.
 48. Bruins, M., Rahim, Z., Bos, A., van de Sande, W.W., Endtz, H.P. and van Belkum, A., *Diagnosis of active tuberculosis by e-nose analysis of exhaled air*. Tuberculosis, **2013**. 93(2): p. 232-238.
 49. Gardner, J., Craven, M., Dow, C. and Hines, E., *The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network*. Measurement Science and Technology, **1998**. 9(1): p. 120.

50. Gibson, T., Prosser, O., Hulbert, J., Marshall, R., Corcoran, P., Lowery, P., Ruck-Keene, E. and Heron, S., *Detection and simultaneous identification of micro-organisms from headspace samples using an electronic nose*. Sensors and Actuators B: Chemical, **1997**. 44(1): p. 413-422.
51. Peng, G., Tisch, U., Adams, O., Hakim, M., Shehada, N., Broza, Y.Y., Billan, S., Abdah-Bortnyak, R., Kuten, A. and Haick, H., *Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles*. Nature nanotechnology, **2009**. 4(10): p. 669-673.
52. Chen, S., Wang, Y. and Choi, S., *Applications and technology of electronic nose for clinical diagnosis*. **2013**.
53. Brondel, L., Jacquin, A., Meillon, S. and Pénicaud, L., *Le goût : physiologie, rôles et dysfonctionnements*. Nutrition Clinique et Métabolisme, **2013**. 27(3): p. 123-133.
54. Trivedi, B.P., *Gustatory system: The finer points of taste*. Nature, **2012**. 486(7403): p. S2-S3.
55. Lindemann, B., *Sodium taste*. Current opinion in nephrology and hypertension, **1997**. 6(5): p. 425-429.
56. Lin, W., Finger, T.E., Rossier, B.C. and Kinnamon, S.C., *Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone*. Journal of Comparative Neurology, **1999**. 405(3): p. 406-420.
57. Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J. and Zuker, C.S., *An amino-acid taste receptor*. Nature, **2002**. 416(6877): p. 199-202.
58. Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J. and Zuker, C.S., *Mammalian sweet taste receptors*. Cell, **2001**. 106(3): p. 381-390.
59. Lindemann, B., *Receptors and transduction in taste*. Nature, **2001**. 413(6852): p. 219-225.
60. Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vosshall, L.B. and Keller, A., *Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli*. Science, **2014**. 343(6177): p. 1370-1372.
61. Pelosi, P., *Odorant-binding proteins*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, **1994**. 29(3): p. 199-228.
62. Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. and Cambillau, C., *Mammalian odorant binding proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, **2000**. 1482(1): p. 229-240.
63. Meierhenrich, U.J., Golebiowski, J., Fernandez, X. and Cabrol-Bass, D., *The molecular basis of olfactory chemoreception*. Angewandte Chemie International Edition, **2004**. 43(47): p. 6410-6412.
64. Buck, L.B., *Unraveling the sense of smell (Nobel lecture)*. Angewandte Chemie-International Edition, **2005**. 44(38): p. 6128-6140.
65. Sankaran, S., Khot, L.R. and Panigrahi, S., *Biology and applications of olfactory sensing system: A review*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2012**. 171: p. 1-17.
66. Briand, L., *Odorant-Binding Proteins*, in *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009, Springer. p. 2953-2957.
67. Buck, L. and Axel, R., *A novel multigene family may encode odorant receptors-A molecular-basis for odor recognition*. . Cell, **1991**. 65(1): p. 175-187.
68. Meierhenrich, U.J., *De la molécule à l'odeur. Les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction. Partie 1/2*. Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle, **2006**. 33(120): p. 19-23.

69. Yu, W.-P., Rajasegaran, V., Yew, K., Loh, W.-I., Tay, B.-H., Amemiya, C.T., Brenner, S. and Venkatesh, B., *Elephant shark sequence reveals unique insights into the evolutionary history of vertebrate genes: a comparative analysis of the protocadherin cluster*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2008**. 105(10): p. 3819-3824.
70. Tudor Kalit, M., Marković, K., Kalit, S., Vahčić, N. and Havranek, J., *Application of electronic nose and electronic tongue in the dairy industry*. Mljekarstvo, **2014**. 64(4): p. 228-244.
71. Gutiérrez, M., Llobera, A., Ipatov, A., Vila-Planas, J., Mínguez, S., Demming, S., Büttgenbach, S., Capdevila, F., Domingo, C. and Jiménez-Jorquera, C., *Application of an e-tongue to the analysis of monovarietal and blends of white wines*. Sensors, **2011**. 11(5): p. 4840-4857.
72. Toko, K., Matsuno, T., Yamafuji, K., Hayashi, K., Ikezaki, H., Sato, K., Toukubo, R. and Kawarai, S., *Multichannel taste sensor using electric potential changes in lipid membranes*. Biosensors and Bioelectronics, **1994**. 9(4): p. 359-364.
73. Gardner, J. and Bartlett, P., *Pattern recognition in odour sensing*, in *Sensors and sensory systems for an electronic nose*. 1992, Springer. p. 161-179.
74. Persaud, K. and Pelosi, P., *Sensor arrays using conducting polymers for an artificial nose*, in *Sensors and sensory systems for an electronic nose*. 1992, Springer. p. 237-256.
75. Newman, A.R., *Electronic noses*. Analytical chemistry, **1991**. 63(10): p. 585A-588A.
76. Pranjal kalita, Manash protim saikia and N.H. Singh, *Electronic-Nose Technology and its Application -A Systematic Survey*. International Journal of Innovative Research in Electrical, Electronics, Instrumentation and Control Engineering, **2015**. 3(1).
77. Haider, C., *Electrodes en potentiométrie*. 2004: Metrohm AG.
78. Hayashi, K., Yamanaka, M., Toko, K. and Yamafuji, K., *Multichannel taste sensor using lipid membranes*. Sensors and Actuators B: Chemical, **1990**. 2(3): p. 205-213.
79. Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y., Di Natale, C., Mazzone, E. and D'Amico, A., *Application of Electronic Tongue for Quantitative Analysis of Mineral Water and Wine*. Electroanalysis, **1999**. 11(10-11): p. 814-820.
80. Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y. and Toko, K., *Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores*. Sensors, **2010**. 10(4): p. 3411-3443.
81. Woertz, K., Tissen, C., Kleinebudde, P. and Breitzkreutz, J., *Taste sensing systems (electronic tongues) for pharmaceutical applications*. International journal of pharmaceutics, **2011**. 417(1): p. 256-271.
82. Hayashi, N., Chen, R., Ikezaki, H., Yamaguchi, S., Maruyama, D., Yamaguchi, Y., Ujihara, T. and Kohata, K., *Techniques for universal evaluation of astringency of green tea infusion by the use of a taste sensor system*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, **2006**. 70(3): p. 626-631.
83. Hayashi, N., Chen, R., Ikezaki, H. and Ujihara, T., *Evaluation of the umami taste intensity of green tea by a taste sensor*. Journal of agricultural and food chemistry, **2008**. 56(16): p. 7384-7387.
84. Iiyama, S., Yahiro, M. and Toko, K., *Measurements of soy sauce using taste sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2000**. 66(1): p. 205-206.
85. Tahara, Y. and Toko, K., *Electronic tongues—A review*. Sensors Journal, IEEE, **2013**. 13(8): p. 3001-3011.

86. Evtugyn, G., *Biosensors: Essentials*. 2014: Springer, **ISBN**: 3642402402.
87. Marc, D., *Capteurs biochimiques*. Techniques de l'ingénieur Analyse et mesure en biotechnologie, **2010**. base documentaire : TIB160DUO(ref. article : r421).
88. Winquist, F., Lundstrom, I. and Wide, P., *The combination of an electronic tongue and an electronic nose*. Sensors and Actuators B-Chemical, **1999**. 58(1-3): p. 512-517.
89. Winquist, F., Krantz-Rülcker, C. and Lundström, I., *Electronic tongues and combinations of artificial senses*. Sensors Update, **2002**. 11(1): p. 279-306.
90. Winquist, F., *Voltammetric electronic tongues - basic principles and applications*. Microchimica Acta, **2008**. 163(1-2): p. 3-10.
91. Ivarsson, P., Holmin, S., Höjer, N.-E., Krantz-Rülcker, C. and Winquist, F., *Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2001**. 76(1): p. 449-454.
92. Ivarsson, P., Kikkawa, Y., Winquist, F., Krantz-Rülcker, C., Höjer, N.-E., Hayashi, K., Toko, K. and Lundström, I., *Comparison of a voltammetric electronic tongue and a lipid membrane taste sensor*. Analytica Chimica Acta, **2001**. 449(1): p. 59-68.
93. Soderstrom, C., Boren, H., Winquist, F. and Krantz-Rulcker, C., *Use of an electronic tongue to analyze mold growth in liquid media*. International Journal of Food Microbiology, **2003**. 83(3): p. 253-261.
94. Apetrei, C., Apetrei, I., Nevares, I., Del Alamo, M., Parra, V., Rodríguez-Méndez, M.L. and De Saja, J., *Using an e-tongue based on voltammetric electrodes to discriminate among red wines aged in oak barrels or aged using alternative methods: correlation between electrochemical signals and analytical parameters*. Electrochimica Acta, **2007**. 52(7): p. 2588-2594.
95. Albert, K.J., Lewis, N.S., Schauer, C.L., Sotzing, G.A., Stitzel, S.E., Vaid, T.P. and Walt, D.R., *Cross-reactive chemical sensor arrays*. Chemical reviews, **2000**. 100(7): p. 2595-2626.
96. Höök, F., Rodahl, M., Kasemo, B. and Brzezinski, P., *Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: effects of pH, ionic strength, and ligand binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **1998**. 95(21): p. 12271-12276.
97. Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K. and Elwing, H., *Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study*. Analytical chemistry, **2001**. 73(24): p. 5796-5804.
98. Compagnone, D., Faieta, M., Pizzoni, D., Di Natale, C., Paolesse, R., Van Caelenberg, T., Beheydt, B. and Pittia, P., *Quartz crystal microbalance gas sensor arrays for the quality control of chocolate*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2015**. 207: p. 1114-1120.
99. Jacesko, S., Abraham, J.K., Ji, T., Varadan, V.K., Cole, M. and Gardner, J.W., *Investigations on an electronic tongue with polymer microfluidic cell for liquid sensing and identification*. Smart materials and structures, **2005**. 14(5): p. 1010.
100. Arshak, K., Moore, E., Lyons, G., Harris, J. and Clifford, S., *A review of gas sensors employed in electronic nose applications*. Sensor review, **2004**. 24(2): p. 181-198.
101. Zhang, C. and Suslick, K.S., *A colorimetric sensor array for organics in water*. Journal of the American Chemical Society, **2005**. 127(33): p. 11548-11549.
102. SAVAGE, N., *The taste of things to come*. Nature, **2012**. 486(7403).

103. Feng, L., Musto, C.J., Kemling, J.W., Lim, S.H., Zhong, W. and Suslick, K.S., *Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals*. Analytical chemistry, **2010**. 82(22): p. 9433-9440.
104. Rakow, N.A. and Suslick, K.S., *A colorimetric sensor array for odour visualization*. Nature, **2000**. 406(6797): p. 710-713.
105. Suslick, B.A., Feng, L. and Suslick, K.S., *Discrimination of complex mixtures by a colorimetric sensor array: coffee aromas*. Analytical chemistry, **2010**. 82(5): p. 2067-2073.
106. Carey, J.R., Suslick, K.S., Hulkower, K.I., Imlay, J.A., Imlay, K.R.C., Ingison, C.K., Ponder, J.B., Sen, A. and Wittrig, A.E., *Rapid Identification of Bacteria with a Disposable Colorimetric Sensing Array*. Journal of the American Chemical Society, **2011**. 133(19): p. 7571-7576.
107. Zhang, C., Bailey, D.P. and Suslick, K.S., *Colorimetric sensor arrays for the analysis of beers: a feasibility study*. Journal of agricultural and food chemistry, **2006**. 54(14): p. 4925-4931.
108. Musto, C.J. and Suslick, K.S., *Differential sensing of sugars by colorimetric arrays*. Current opinion in chemical biology, **2010**. 14(6): p. 758-766.
109. Gottlieb, H.E., Ben-Ari, C., Hassner, A. and Marks, V., *Side-chain rotational processes in pentaethylated benzenes*. Tetrahedron, **1999**. 55(13): p. 4003-4014.
110. Wright, A.T., Griffin, M.J., Zhong, Z.L., McCleskey, S.C., Anslyn, E.V. and McDevitt, J.T., *Differential receptors create patterns that distinguish various proteins*. Angewandte Chemie-International Edition, **2005**. 44(39): p. 6375-6378.
111. Kuivila, H.G., Keough, A.H. and Soboczenski, E.J., *Areneboronates from diols and polyols*. Journal of Organic Chemistry, **1954**. 19(5): p. 780-783.
112. Lorand, J.P. and EDWARDS, J.O., *Polyol complexes and structure of the benzeneboronate ion*. The Journal of Organic Chemistry, **1959**. 24(6): p. 769-774.
113. Wiskur, S.L., Lavigne, J.J., Ait-Haddou, H., Lynch, V., Chiu, Y.H., Canary, J.W. and Anslyn, E.V., *p K a Values and Geometries of Secondary and Tertiary Amines Complexed to Boronic Acids Implications for Sensor Design*. Organic letters, **2001**. 3(9): p. 1311-1314.
114. McCleskey, S.C., Griffin, M.J., Schneider, S.E., McDevitt, J.T. and Anslyn, E.V., *Differential receptors create patterns diagnostic for ATP and GTP*. Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125(5): p. 1114-1115.
115. Goodey, A., Lavigne, J.J., Savoy, S.M., Rodriguez, M.D., Curey, T., Tsao, A., Simmons, G., Wright, J., Yoo, S.-J. and Sohn, Y., *Development of multianalyte sensor arrays composed of chemically derivatized polymeric microspheres localized in micromachined cavities*. Journal of the American chemical society, **2001**. 123(11): p. 2559-2570.
116. Wright, A.T. and Anslyn, E.V., *Cooperative metal-coordination and ion pairing in tripeptide recognition*. Organic letters, **2004**. 6(9): p. 1341-1344.
117. Schneider, S.E., O'Neil, S.N. and Anslyn, E.V., *Coupling rational design with libraries leads to the production of an ATP selective chemosensor*. Journal of the American Chemical Society, **2000**. 122(3): p. 542-543.
118. Wright, A.T., Anslyn, E.V. and McDevitt, J.T., *A differential array of metalated synthetic receptors for the analysis of tripeptide mixtures*. Journal of the American Chemical Society, **2005**. 127(49): p. 17405-17411.
119. Umali, A.P., LeBoeuf, S.E., Newberry, R.W., Kim, S., Tran, L., Rome, W.A., Tian, T., Taing, D., Hong, J. and Kwan, M., *Discrimination of flavonoids and*

- red wine varieties by arrays of differential peptidic sensors*. Chemical Science, **2011**. 2(3): p. 439-445.
120. Folmer-Andersen, J.F., Kitamura, M. and Anslyn, E.V., *Pattern-based discrimination of enantiomeric and structurally similar amino acids: An optical mimic of the mammalian taste response*. Journal of the American Chemical Society, **2006**. 128(17): p. 5652-5653.
 121. Reddy, M.M. and Kodadek, T., *Protein "fingerprinting" in complex mixtures with peptoid microarrays*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2005**. 102(36): p. 12672-12677.
 122. Wright, A.T., Edwards, N.Y., Anslyn, E.V. and McDevitt, J.T., *The discriminatory power of differential receptor arrays is improved by prescreening—a demonstration in the analysis of tachykinins and similar peptides*. Angewandte Chemie International Edition, **2007**. 46(43): p. 8212-8215.
 123. Edwards, N.Y., Sager, T.W., McDevitt, J.T. and Anslyn, E.V., *Boronic acid based peptidic receptors for pattern-based saccharide sensing in neutral aqueous media, an application in real-life samples*. Journal of the American Chemical Society, **2007**. 129(44): p. 13575-13583.
 124. Jain, R.K. and Hamilton, A.D., *Protein surface recognition by synthetic receptors based on a tetraphenylporphyrin scaffold*. Organic Letters, **2000**. 2(12): p. 1721-1723.
 125. Baldini, L., Wilson, A.J., Hong, J. and Hamilton, A.D., *Pattern-based detection of different proteins using an array of fluorescent protein surface receptors*. Journal of the American Chemical Society, **2004**. 126(18): p. 5656-5657.
 126. Miranda, O.R., You, C.C., Phillips, R., Kim, I.B., Ghosh, P.S., Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M., *Array-based sensing of proteins using conjugated polymers*. Journal of the American Chemical Society, **2007**. 129(32): p. 9856-+.
 127. Miranda, O.R., Li, X., Garcia-Gonzalez, L., Zhu, Z.-J., Yan, B., Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M., *Colorimetric Bacteria Sensing Using a Supramolecular Enzyme–Nanoparticle Biosensor*. Journal of the American Chemical Society, **2011**. 133(25): p. 9650-9653.
 128. You, C.C., Miranda, O.R., Gider, B., Ghosh, P.S., Kim, I.B., Erdogan, B., Krovi, S.A., Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M., *Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors*. Nature Nanotechnology, **2007**. 2(5): p. 318-323.
 129. You, C.-C., De, M. and Rotello, V.M., *Contrasting Effects of Exterior and Interior Hydrophobic Moieties in the Complexation of Amino Acid Functionalized Gold Clusters with α -Chymotrypsin*. Organic Letters, **2005**. 7(25): p. 5685-5688.
 130. De, M., You, C.-C., Srivastava, S. and Rotello, V.M., *Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: a thermodynamic study*. Journal of the American Chemical Society, **2007**. 129(35): p. 10747-10753.
 131. De, M., Rana, S., Akpınar, H., Miranda, O.R., Arvizo, R.R., Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M., *Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein*. Nature Chemistry, **2009**. 1(6): p. 461-465.
 132. Phillips, R.L., Miranda, O.R., You, C.C., Rotello, V.M. and Bunz, U.H.F., *Rapid and efficient identification of bacteria using gold-nanoparticle - Poly(para-phenyleneethynylene) constructs*. Angewandte Chemie-International Edition, **2008**. 47(14): p. 2590-2594.
 133. Fischer, W., *Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids*. 1990, Kates, M. ed.

134. Dmitriev, B., Toukach, F. and Ehlers, S., *Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall*. *TRENDS in Microbiology*, **2005**. 13(12): p. 569-574.
135. Bajaj, A., Miranda, O.R., Phillips, R., Kim, I.-B., Jerry, D.J., Bunz, U.H.F. and Rotello, V.M., *Array-Based Sensing of Normal, Cancerous, and Metastatic Cells Using Conjugated Fluorescent Polymers*. *Journal of the American Chemical Society*, **2010**. 132(3): p. 1018-1022.
136. Saha, K., Agasti, S.S., Kim, C., Li, X.N. and Rotello, V.M., *Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing*. *Chemical Reviews*, **2012**. 112(5): p. 2739-2779.
137. Miranda, O.R., Creran, B. and Rotello, V.M., *Array-based sensing with nanoparticles: 'Chemical noses' for sensing biomolecules and cell surfaces*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**. 14(6): p. 728-736.
138. Piliarik, M., Parova, L. and Homola, J., *High-throughput SPR sensor for food safety*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2009**. 24(5): p. 1399-1404.
139. Piliarik, M. and Homola, J., *Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?* *Optics Express*, **2009**. 17(19): p. 16505-16517.
140. Campbell, C.T. and Kim, G., *SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics*. *Biomaterials*, **2007**. 28(15): p. 2380-2392.
141. Livache, T., Buhot, A., Bonnaffe, D. and Hou-BROUTIN, Y., *Electronic Nose or Tongue Sensors*. 2013, Licencié à Aryballe Technologies.
142. Hou, Y.X., Genua, M., Batista, D.T., Calemczuk, R., Buhot, A., Fornarelli, P., Koubachi, J., Bonnaffe, D., Saesen, E., Laguri, C., Lortat-Jacob, H. and Livache, T., *Continuous Evolution Profiles for Electronic-Tongue-Based Analysis*. *Angewandte Chemie-International Edition*, **2012**. 51(41): p. 10394-10398.
143. Thèse: GENUA, M., *Développement d'une langue électronique sur des surfaces combinatoires : Applications analytiques et conception de surfaces biomimétiques 2D et 3D*, 2013.
144. Kretschmann, E. and Raether, H., *Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light*. **1968**: p. 2135-2136
145. Lieberg, B., Nylander, C. and Lundstrom, I., *Surface-Plasmon Resonance for gas detection and biosensing*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **1983** 4(2): p. 299-304
146. Vigoureux, J.M., *De l'onde évanescence de Fresnel au champ proche optique*. *Annales de la Fondation Louis de Broglie*, **2003**. 28(3-4): p. 525-548.
147. LY-MORIN., E., BELLON., S., MÉLIZZI., G. and FRYDMAN, C., *Biomarker Discovery using Surface Plasmon Resonance Imaging*. *Horiba Technical Reports*, **2012**. Edition No.39: p. 82-87.
148. Lecaruyer, P., Mannelli, I., Courtois, V., Goossens, M. and Canva, M., *Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument - Application to biochip genotyping*. *Analytica Chimica Acta*, **2006**. 573: p. 333-340.
149. Thèse: Daniel, C., *Biopuce à aptamères anti-thrombine: exploration d'une technique alternative de détection*, 2013.
150. Homola, J., *Surface plasmon resonance based sensors*, ed. S.S.C.S.a. *Biosensors*. Vol. 4. 2006, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media, **ISBN**: 3540339191.

151. Thèse: Maillart, E., *Imagerie par resonance des plasmons de surface pour l'analyse simultannée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel.*, 2004.
152. Porter, M.D., Bright, T.B., Allara, D.L. and Chidsey, C.E.D., *Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry.* Journal of the American Chemical Society, **1987**. 109(12): p. 3559-3568.
153. Bain, C.D., Troughton, E.B., Tao, Y.T., Evall, J., Whitesides, G.M. and Nuzzo, R.G., *Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold.* . Journal of the American Chemical Society, **1989**. 111(1): p. 321-335.
154. Nuzzo, R.G., Fusco, F.A. and Allara, D.L., *Spontaneously organized molecular assemblies . 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces.* Journal of the American Chemical Society, **1987**. 109(8): p. 2358-2368.
155. Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R. and Dubois, L.H., *Fundamental-studies of the chemisorption of organosulfur compound on Au(111)- Implications for molecular self-assembly on gold surfaces.* . Journal of the American Chemical Society, **1987**. 109(3): p. 733-740.
156. Bain, C.D. and Whitesides, G.M., *Molecular-level control over surfaces order in self-assembled monolayer films of thiols on gold.* Science, **1988**. 240(4848): p. 62-63.
157. Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. and Whitesides, G.M., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology.* Chemical reviews, **2005**. 105(4): p. 1103-1170.
158. Stranick, S.J., Atre, S.V., Parikh, A.N., Wood, M.C., Allara, D.L., Winograd, N. and Weiss, P.S., *Nanometer-scale phase separation in mixed composition self-assembled monolayers.* Nanotechnology, **1996**. 7(4): p. 438-442.
159. Baccini, A., *Statistique Descriptive Multidimensionnelle (pour les nuls).* Institut de Mathématiques de Toulouse-UMR CNRS, **2010**. 5219.
160. Alcaniz, M., Vivancos, J.L., Masot, R., Ibanez, J., Raga, M., Soto, J. and Martinez-Manez, R., *Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy.* Journal of Food Engineering, **2012**. 111(1): p. 122-128.
161. <http://legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000571276>.
162. Lazcka, O., Campo, F.J.D. and Muñoz, F.X., *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors.* Biosensors and Bioelectronics, **2007**. 22(7): p. 1205-1217.
163. Institut-Pasteur, *Site de l'Institut Pasteur : fiches info Staphylocoque.*
<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque#sthash.Ocwu0rmh.dpuf>.
164. Myers, G.S., Rasko, D.A., Cheung, J.K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R.T., Ren, Q., Varga, J., Awad, M.M. and Brinkac, L.M., *Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, Clostridium perfringens.* Genome research, **2006**. 16(8): p. 1031-1040.
165. Struelens, M., *Rapid identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and patient management.* Clinical microbiology and infection, **2006**. 12(s9): p. 23-26.
166. Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Küçük karaaslan, A., Baysallar, M. and Başustaoğlu, A.C., *Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers.* Food Control, **2004**. 15(4): p. 253-259.

167. Brenner, D.J., Staley, J.T. and Krieg, N.R., *Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation*, in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2005, Springer. p. 27-32.
168. Jimenez, L., *Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, **2001**. 55(5): p. 278-285.
169. Baldoni, D., Hermann, H., Frei, R., Trampuz, A. and Steinhuber, A., *Performance of microcalorimetry for early detection of methicillin resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Journal of clinical microbiology, **2009**. 47(3): p. 774-776.
170. Trampuz, A., Salzmann, S., Antheaume, J. and Daniels, A.U., *Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products*. Transfusion, **2007**. 47(9): p. 1643-1650.
171. Meszaros, A., *Alternative technologies for sterility testing*. Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry, **2003**: p. 121.
172. MOLDENHAUER, J., *Rapid microbiological methods and the PAT initiative*. Biopharm international, **2005**: p. 11-20.
173. Moldenhauer, J., *Overview of rapid microbiological methods*, in *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. 2008, Springer. p. 49-79.
174. Baena, J.R. and Lendl, B., *Raman spectroscopy in chemical bioanalysis*. Current opinion in chemical biology, **2004**. 8(5): p. 534-539.
175. Schwartz, T., Jungfer, C., Heißler, S., Friedrich, F., Faubel, W. and Obst, U., *Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks*. Chemosphere, **2009**. 77(2): p. 249-257.
176. Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A. and Chambers, J.P., *A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents*. Biosensors and Bioelectronics, **2000**. 15(11): p. 549-578.
177. Kim, J.S., Lee, G.G., Park, J.S., Jung, Y.H., Kwak, H.S., Kim, S.B., Nam, Y.S. and Kwon, S.-T., *A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: Escherichia coli O157: H7, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, and Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection®, **2007**. 70(7): p. 1656-1662.
178. Slimani, S., Robyns, A., Jarraud, S., Molmeret, M., Dusserre, E., Mazure, C., Facon, J.P., Lina, G., Etienne, J. and Ginevra, C., *Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR*. Journal of microbiological methods, **2012**. 88(2): p. 319-321.
179. Yáñez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L. and Catalán, V., *Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR*. Journal of microbiological methods, **2011**. 85(2): p. 124-130.
180. Davis, M.A., Hancock, D.D., Besser, T.E. and Call, D.R., *Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of Escherichia coli O157: H7*. Journal of clinical microbiology, **2003**. 41(5): p. 1843-1849.
181. Robuffo, I., Fazii, P., Rulli, A., Di Nicola, M., Toniato, E., Di Rienzo, M., Cosentino, L., Gambi, A., Castellani, M. and Martinotti, S., *Upgraded diagnostic value of Gen-Probe PACE 2 assay for detection of Chlamydia*

- trachomatis* infection. Journal of biological regulators and homeostatic agents, **2007**. 22(4): p. 253-261.
182. Thèse: Bouguelia, S., *Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux*, 2012.
 183. Bouguelia, S., Roupioz, Y., Slimani, S., Mondani, L., Casabona, M.G., Durmort, C., Vernet, T., Calemczuk, R. and Livache, T., *On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria*. Lab on a Chip, **2013**. 13(20): p. 4024-4032.
 184. Mondani, L., Roupioz, Y., Delannoy, S., Fach, P. and Livache, T., *Simultaneous enrichment and optical detection of low levels of stressed Escherichia coli O157:H7 in food matrices*. Journal of Applied Microbiology, **2014**. 117(2): p. 537-546.
 185. Bulard, E., Bouchet-Spinelli, A., Chaud, P., Roget, A., Calemczuk, R., Fort, S. and Livache, T., *Carbohydrates as New Probes for the Identification of Closely Related Escherichia coli Strains Using Surface Plasmon Resonance Imaging*. Analytical Chemistry, **2015**. 87(3): p. 1804-1811.
 186. Su, L. and Chiu, C., *Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature*. Chang Gung medical journal, **2007**. 30(3): p. 210.
 187. World-Health-Organization, *Food safety* :
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
 188. Lowy, F.D., *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Investigation, **2003**. 111(9): p. 1265.
 189. Kloos, W.E. and Schleifer, K.H., *Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of four new species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans*. International Journal of Systematic Bacteriology, **1975**. 25(1): p. 62-79.
 190. Wieser, M. and Busse, H., *Rapid identification of Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2000**. 50(3): p. 1087-1093.
 191. Presterl, E., Suchomel, M., Eder, M., Reichmann, S., Lassnigg, A., Graninger, W. and Rotter, M., *Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of Staphylococcus epidermidis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2007**. 60(2): p. 417-420.
 192. Thèse: Russo, C.T., *Etude et Réalisation de jonctions p/n en diamant*, 2006.
 193. Holloway, H., Hass, K., Tamor, M., Anthony, T. and Banholzer, W., *Isotopic dependence of the lattice constant of diamond*. Physical Review B, **1991**. 44(13): p. 7123.
 194. Thèse: Gehin, T., *Mise en oeuvre de l'épitaxie par jets moléculaires pour la synthèse de diamant monocristallin*, 2004.
 195. Shih, H., Sung, C., Lee, C., Fan, W. and Chen, J., *Application of diamond coating to tool steels*. Diamond and Related Materials, **1992**. 1(5): p. 605-611.
 196. Plamann, K., Fournier, D., Anger, E. and Gicquel, A., *Photothermal examination of the heat diffusion inhomogeneity in diamond films of sub-micron thickness*. Diamond and Related Materials, **1994**. 3(4): p. 752-756.
 197. Thèse: Agnès, C., *Le diamant dopé au bore pour la bioélectronique: Biocompatibilité et Fonctionnalisation*, 2009.
 198. Tang, L., Tsai, C., Gerberich, W.W., Kruckeberg, L. and Kania, D.R., *Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond*. Biomaterials, **1995**. 16(6): p. 483-488.
 199. Rodrigues, A.A., Baranauskas, V., Ceragioli, H.J., Peterlevitz, A.C. and Belangero, W.D., *In vivo preliminary evaluation of bone-microcrystalline and*

- bone-nanocrystalline diamond interfaces*. Diamond and Related Materials, **2010**. 19(10): p. 1300-1306.
200. Kopecek, M., Bacakova, L., Vacik, J., Fendrych, F., Vorlicek, V., Kratochvilova, I., Lisa, V., Van Hove, E., Mer, C., Bergonzo, P. and Nesladek, M., *Improved adhesion, growth and maturation of human bone-derived cells on nanocrystalline diamond films*. physica status solidi (a), **2008**. 205(9): p. 2146-2153.
 201. Keefer, E.W., Botterman, B.R., Romero, M.I., Rossi, A.F. and Gross, G.W., *Carbon nanotube coating improves neuronal recordings*. Nat Nano, **2008**. 3(7): p. 434-439.
 202. Specht, C.G., Williams, O.A., Jackman, R.B. and Schoepfer, R., *Ordered growth of neurons on diamond*. Biomaterials, **2004**. 25(18): p. 4073-4078.
 203. Thalhammer, A., Edgington, R.J., Cingolani, L.A., Schoepfer, R. and Jackman, R.B., *The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks*. Biomaterials, **2010**. 31(8): p. 2097-2104.
 204. Edgington, R., Thalhammer, A., Welch, J., Bongrain, A., Bergonzo, P., Scorsone, E., Jackman, R. and Schoepfer, R., *Patterned neuronal networks using nanodiamonds and the effect of varying nanodiamond properties on neuronal adhesion and outgrowth*. Journal of neural engineering, **2013**. 10(5): p. 056022.
 205. Thèse: Fornos, A.P., *Minimum requirements for a retinal prosthesis to restore useful vision.*, 2006.
 206. Madelung, O., *Data, Semiconductors-Basic*. 1996, Springer, Berlin.
 207. Compton, R.G., Foord, J.S. and Marken, F., *Electroanalysis at Diamond-Like and Doped-Diamond Electrodes*. Electroanalysis, **2003**. 15(17): p. 1349-1363.
 208. May, P.W., *Diamond thin films: a 21st-century material*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, **2000**. 358(1766): p. 473-495.
 209. Isberg, J., Hammersberg, J., Johansson, E., Wikström, T., Twitchen, D.J., Whitehead, A.J., Coe, S.E. and Scarsbrook, G.A., *High Carrier Mobility in Single-Crystal Plasma-Deposited Diamond*. Science, **2002**. 297(5587): p. 1670-1672.
 210. Pang, L.Y.S., Chan, S.S.M., Johnston, C., Chalker, P.R. and Jackman, R.B., *High temperature polycrystalline diamond metal-insulator-semiconductor field-effect-transistor*. Diamond and Related Materials, **1997**. 6(2-4): p. 333-338.
 211. Kiyota, H., Matsushima, E., Sato, K., Okushi, H., Ando, T., Kamo, M., Sato, Y. and Iida, M., *Electrical properties of Schottky barrier formed on as-grown and oxidized surface of homoepitaxially grown diamond (001) film*. Applied physics letters, **1995**. 67(24): p. 3596-3598.
 212. Aleksov, A., Kubovic, M., Kasu, M., Schmid, P., Grobe, D., Ertl, S., Schreck, M., Stritzker, B. and Kohn, E., *Diamond-based electronics for RF applications*. Diamond and Related Materials, **2004**. 13(2): p. 233-240.
 213. Kiran, R., Scorsone, E., Mailley, P. and Bergonzo, P., *Quasi-Real Time Quantification of Uric Acid in Urine Using Boron Doped Diamond Microelectrode with in Situ Cleaning*. Analytical Chemistry, **2012**. 84(23): p. 10207-10213.
 214. Swain, G.M., *The Susceptibility to Surface Corrosion in Acidic Fluoride Media: A Comparison of Diamond, HOPG, and Glassy Carbon Electrodes*. Journal of The Electrochemical Society, **1994**. 141(12): p. 3382-3393.
 215. Xu, J., Chen, Q. and Swain, G.M., *Anthraquinonedisulfonate Electrochemistry: A Comparison of Glassy Carbon, Hydrogenated Glassy Carbon, Highly*

- Oriented Pyrolytic Graphite, and Diamond Electrodes*. Analytical Chemistry, **1998**. 70(15): p. 3146-3154.
216. Nebel, C.E., Rezek, B., Shin, D., Uetsuka, H. and Yang, N., *Diamond for bio-sensor applications*. Journal of Physics D-Applied Physics, **2007**. 40(20): p. 6443-6466.
 217. Yang, N., *Novel Aspects of Diamond: From Growth to Applications*. Vol. 121. 2014: Springer, **ISBN**: 3319098349.
 218. Rubio-Retama, J., Hernando, J., Lopez-Ruiz, B., Härtl, A., Steinmüller, D., Stutzmann, M., Lopez-Cabarcos, E. and Antonio Garrido, J., *Synthetic nanocrystalline diamond as a third-generation biosensor support*. Langmuir, **2006**. 22(13): p. 5837-5842.
 219. Fortin, E., Chane-Tune, J., Delabouglise, D., Bouvier, P., Livache, T., Mailley, P., Marcus, B., Mermoux, M., Petit, J.P., Szunerits, S. and Vieil, E., *Interfacing boron doped diamond and biology: An insight on its use for bioanalytical applications*. Electroanalysis, **2005**. 17(5-6): p. 517-526.
 220. Lévy-Clément, C., Ndao, N., Katty, A., Bernard, M., Deneuville, A., Comninellis, C. and Fujishima, A., *Boron doped diamond electrodes for nitrate elimination in concentrated wastewater*. Diamond and related materials, **2003**. 12(3): p. 606-612.
 221. Boye, B., Brillas, E., Marselli, B., Michaud, P.-A., Comninellis, C., Farnia, G. and Sandonà, G., *Electrochemical incineration of chloromethylphenoxy herbicides in acid medium by anodic oxidation with boron-doped diamond electrode*. Electrochimica acta, **2006**. 51(14): p. 2872-2880.
 222. Iniesta, J., Michaud, P., Panizza, M., Cerisola, G., Aldaz, A. and Comninellis, C., *Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode*. Electrochimica Acta, **2001**. 46(23): p. 3573-3578.
 223. Einaga, Y., Fujishima, A., Rao, T. and Tryk, D., *Diamond Electrochemistry*. Chap, **2005**. 25: p. 556-574.
 224. Thèse: Ruffinatto, S., *Le diamant pour la bioélectronique :De la fonctionnalisation chimique à la modification physique par des nanotubes de carbone.*, 2012.
 225. Bundy, F.P., Hall, H.T., Strong, H.M. and Wentorf, R.H., *Man-made diamonds*. Nature, **1955**. 176(4471): p. 51-55.
 226. Norley, J., *The role of natural graphite in electronics cooling*. Electronics Cooling Magazine, **2001**.
 227. Bridgman, P.W., *Synthetic diamonds* Scientific American, **1955**. 193(5): p. 42-46.
 228. Eversole, W.G. and Wilfred, D., *Synthetic rutile and method of making*. 1952, Google Patents.
 229. Thèse: Girard, H., *Traitements électrochimiques contrôlés sur diamant: corrélation entre chimie superficielle et réactivité électrochimique*, 2008.
 230. Tachibana, T., Yokota, Y., Hayashi, K., Miyata, K., Kobashi, K. and Shintani, Y., *Parametric study of bias-enhanced nucleation of diamond on platinum in microwave plasma*. Diamond and Related Materials, **2000**. 9(3): p. 251-255.
 231. Saada, S., Arnault, J., Tranchant, N., Bonnauron, M. and Bergonzo, P., *Study of the CVD process sequences for an improved control of the Bias Enhanced Nucleation step on silicon*. physica status solidi (a), **2007**. 204(9): p. 2854-2859.
 232. Chavanne, A., Barjon, J., Vilquin, B., Arabski, J. and Arnault, J.C., *Surface investigations on different nucleation pathways for diamond heteroepitaxial growth on iridium*. Diamond and Related Materials, **2012**. 22: p. 52-58.

233. Whitfield, M.D., Savage, J.A. and Jackman, R.B., *Nucleation and growth of diamond films on single crystal and polycrystalline tungsten substrates*. Diamond and Related Materials, **2000**. 9(3): p. 262-268.
234. Sato, Y., Kamo, M. and Field, J., *Properties of Natural and Synthetic Diamond*. Academic, London, **1992**.
235. Fujii, T. and Kareev, M., *Mass spectrometric studies of a CH₄/H₂ microwave plasma under diamond deposition conditions*. Journal of Applied Physics, **2001**. 89(5): p. 2543-2546.
236. Angus, J.C., Will, H.A. and Stanko, W.S., *Growth of diamond seed crystals by vapor deposition*. Journal of Applied Physics, **1968**. 39(6): p. 2915-2922.
237. Spitsyn, B., Bouilov, L. and Derjaguin, B., *Diamond and diamond-like films: deposition from the vapour phase, structure and properties*. Progress in crystal growth and characterization, **1988**. 17(2): p. 79-170.
238. Gicquel, A., Silva, F. and Hassouni, K., *Croissance CVD et Optimisation: croissance de films de diamant par plasma*. **2002**.
239. Volpe, P.-N., Pernot, J., Muret, P. and Omnès, F., *High hole mobility in boron doped diamond for power device applications*. Applied Physics Letters, **2009**. 94(9): p. 2102.
240. Badzian, A.R., Badzian, T., Roy, R., Messier, R. and Spear, K., *Crystallization of diamond crystals and films by microwave assisted CVD (Part II)*. Materials research bulletin, **1988**. 23(4): p. 531-548.
241. Anthony, T.R., *Metastable synthesis of diamond*, in *The Physics and Chemistry of Carbides, Nitrides and Borides*. 1990, Springer. p. 133-158.
242. Vietzke, E., Philipps, V., Flaskamp, K., Koidl, P. and Wild, C., *The reaction of atomic hydrogen with aC: H and diamond films*. Surface and Coatings Technology, **1991**. 47(1): p. 156-161.
243. Feng, T. and Schwartz, B.D., *Characteristics and origin of the 1.681 eV luminescence center in chemical-vapor-deposited diamond films*. Journal of applied physics, **1993**. 73(3): p. 1415-1425.
244. Venables, J., Spiller, G. and Hanbucken, M., *Nucleation and growth of thin films*. Reports on Progress in Physics, **1984**. 47(4): p. 399.
245. Hébert, C., Warnking, J., Depaulis, A., Garcon, L.A., Mermoux, M., Eon, D., Mailley, P. and Omnes, F., *Microfabrication, characterization and in vivo MRI compatibility of diamond microelectrodes array for neural interfacing*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, **2015**. 46: p. 25-31.
246. Thèse: Hébert, C., Hébert, *All diamond and diamond/carbon nanotube composite electrode for neurophysiological studies : from the material to the interfacial devices*, 2013.
247. Haubner, R., Lindlbauer, A. and Lux, B., *Diamond deposition on chromium, cobalt and nickel substrates by microwave plasma chemical vapour deposition*. Diamond and related Materials, **1993**. 2(12): p. 1505-1515.
248. Krüger, A., *Hard and soft: biofunctionalized diamond*. Angewandte Chemie International Edition, **2006**. 45(39): p. 6426-6427.
249. Sun, B., Baker, S.E., Butler, J.E., Kim, H., Russell, J.N., Shang, L., Tse, K.-Y., Yang, W. and Hamers, R.J., *Covalent molecular functionalization of diamond thin-film transistors*. Diamond and related materials, **2007**. 16(8): p. 1608-1615.
250. Thèse: Candice, B., *Développement de cristaux photoniques en diamant: modélisation, technologie et application à la biodétection*, 2015.
251. Agnès, C., Ruffinatto, S., Delbarre, E., Roget, A., Arnault, J.-C., Omnès, F. and Mailley, P. *New one step functionalization of polycrystalline diamond films*

- using amine derivatives. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2010. IOP Publishing.
252. Vandenabeele, P., Edwards, H.G. and Moens, L., *A decade of Raman spectroscopy in art and archaeology*. Chemical Reviews, **2007**. 107(3): p. 675-686.
 253. Smith, G.D. and Clark, R.J., *Raman microscopy in archaeological science*. Journal of Archaeological Science, **2004**. 31(8): p. 1137-1160.
 254. Ghodbane, S., Ballutaud, D., Omnès, F. and Agnès, C., *Comparison of the XPS spectra from homoepitaxial {111}, {100} and polycrystalline boron-doped diamond films*. Diamond and Related Materials, **2010**. 19(5–6): p. 630-636.
 255. Tubino, R., Piseri, L. and Zerbi, G., *Lattice Dynamics and Spectroscopic Properties by a Valence Force Potential of Diamondlike Crystals: C, Si, Ge, and Sn*. The Journal of Chemical Physics, **1972**. 56(3): p. 1022-1039.
 256. Faulkner, L. and Bard, A., *Electrochimie: Principes, méthodes et applications*. 1983, Masson Edition.
 257. Fleischmann, M. and Pons, S., *The behavior of microdisk and microring electrodes. Mass transport to the disk in the unsteady state: The ac response*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, **1988**. 250(2): p. 277-283.
 258. Thèse: Vanhove, É., *Électrodes en diamant B-NCD: optimisation du matériau pour la stabilisation d'une réactivité élevée*, 2010.
 259. Williams, O.A., Nesladek, M., Daenen, M., Michaelson, S., Hoffman, A., Osawa, E., Haenen, K. and Jackman, R., *Growth, electronic properties and applications of nanodiamond*. Diamond and Related Materials, **2008**. 17(7): p. 1080-1088.
 260. Kim, Y.-K., Han, Y.-S. and Lee, J.-Y., *The effects of a negative bias on the nucleation of oriented diamond on Si*. Diamond and related materials, **1998**. 7(1): p. 96-105.
 261. Thèse: Gheeraert, E., *Défauts de structure et impuretés dans les couches minces de diamant élaborées par dépôt chimique en phase vapeur*, 1992.
 262. Matsumoto, S., Sato, Y., Tsutsumi, M. and Setaka, N., *Growth of diamond particles from methane-hydrogen gas*. Journal of Materials Science, **1982**. 17(11): p. 3106-3112.
 263. Thèse: Daher, C., *Raman and infrared spectroscopies analysis of natural organic media of cultural Heritage interests: methodological approach and applications*, 2012.
 264. Paul, D., Jacques, B., Daniel, B., Guy, B., Michel, D. and François, F., *Spectrométrie Raman*. Techniques de l'ingénieur CND : méthodes surfaciques, **1999**. base documentaire : TIB586DUO(ref. article : p2865).

Résumé :

L'objectif de cette thèse est d'explorer les applications potentielles d'un système de langue électronique basée sur des récepteurs combinatoires à réactivités croisées et l'imagerie par résonance de plasmons de surface, pour l'analyse et la discrimination de différents milieux complexes et de bactéries. L'étude de milieux complexes a été réalisée sur des échantillons de différentes natures comme le vin, la bière et le lait d'origines végétale et animale. Les expériences ont démontré que notre système de langue électronique est capable de répondre avec une bonne sélectivité à ces milieux complexes et qu'il génère ainsi des profils continus 2D et des images 3D, propres à chaque échantillon. La différenciation et la classification de ces divers types de boissons ont été réalisées grâce à ces signatures 2D et 3D. Le dispositif a également prouvé son efficacité pour le suivi du vieillissement du lait. Une seconde étude a été dédiée à l'application du système pour la détection de bactéries. Dans un premier temps, des paramètres fluidiques ont été optimisés comme la forme et la profondeur de la cuve ou le débit fluidique, en raison de la morphologie variable des bactéries, considérées ici comme des objets biologiques complexes et volumineux. Dans un second temps, le système s'est révélé performant pour l'analyse de bactéries et a montré la possibilité de quantifier ces analyses. En effet, la langue électronique a permis la discrimination de différentes bactéries selon leur genre, leur espèce et en fonction des souches grâce aux profils continus 2D et aux images 3D.

Abstract:

The objective of this PhD thesis is to explore the potential applications of the electronic tongue, based on combinatorial cross-reactive receptors and surface plasmon resonance imaging, for analysis and discrimination of different complex mixtures and bacteria. In this work, various complex mixtures of different nature such as wine, beer, and milk (either animal-based or plant-based) are used. It has been demonstrated that the electronic tongue is capable of responding differently to these samples with good selectivity. For each of them, it can generate characteristic continuous 2D profile and 3D image, based on which the differentiation and classification of the complex mixtures have been carried out. Furthermore, it has been illustrated that the electronic tongue is efficient for monitoring the deterioration of milk. In the second part of this thesis, the electronic tongue has been applied for detection and analysis of bacteria. At first, some fluidic parameters have been optimized due to the variable morphology of these complexes and large biological objects. Under optimized experimental conditions, the electronic tongue is effective for analysis of bacteria with the possibility for quantification. Thereafter, the electronic tongue has allowed for the discrimination of different bacteria according to their genus, species and strains based on continuous 2D profiles and 3D images.